Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G.A. Martini

DIE WIRKUNG VON LITHIUM AUF DIE ENDOKRINE FUNKTION VON SCHILDDRÜSE UND NEBENNIERENRINDE IM TIERVERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bertram Schollmeier
aus Heppenheim

Marburg 1978

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
Direktor: Professor Dr. med. G.A. Martini

DIE WIRKUNG VON LITHIUM AUF DIE ENDOKRINE FUNKTION VON SCHILDDRÜSE UND NEBENNIERENRINDE IM TIERVERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bertram Schollmeier
aus Heppenheim

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. H. Gerdes
Korreferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
1. Lithium und die Schilddrüse	
Literaturübersicht über klinische und tierexperimentelle Befunde	5
2. Lithium und die Nebennierenrindentätigkeit	
Literaturübersicht über klinische und tierexperimentelle Befunde	9
II. Eigene experimentelle Untersuchungen	
Material und Methodik	
1. Versuchsansätze	11
2. Serumbestimmungen	
a) 3',5'-cyclo Adenosinmonophosphat (cAMP)	13
Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsmethode	14
b) Gesamtthyroxinbestimmung und Normal Thyroxin Ratio (NTR)	17
Testprinzip T_4	17
Prinzip der Normal Thyroxin Ratio (NTR)	18
c) Corticosteron	
Corticosteronextraktion aus Serum	21
Prinzip des Radioimmunoassays	22

Seite

3. Gewebebestimmung

Corticosteron
- Extraktion von Corticosteron aus Nebennierengewebe 25
- Methode zur chromatographischen Abtrennung von Corticosteron aus Gewebeextrakten 26
- Dünnschichtchromatographische Trennung des Corticosteron von anderen Steroiden 27
- Präparation einer Silicagelsäule zur chromatographischen Extraktion von Corticosteron 31
- Blankwertbestimmung 39
- Wiederfindungsmessung 41

4. Mathematisch-statistische Auswertung 42

III. Ergebnisse

1. TSH-Versuch 45
2. Thyroxin-Versuch 54
3. ACTH-Versuch 57

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. TSH-/T_4-Versuch 69
2. ACTH-Versuch 72

IV. Diskussion der Ergebnisse

1. TSH-/T_4-Versuch 74
2. ACTH-Versuch 79

V. Zusammenfassung und Schluß

1. TSH-/T_4-Versuch 83
2. ACTH-Versuch 84

VI. Literaturverzeichnis 86

Verwendete Reagentien und Geräte 97

I. Einleitung und Problemstellung

Bei der therapeutischen Verwendung von Lithiumsalzen in der Psychiatrie zur Behandlung manisch-depressiver Zustände ist etwa in den letzten 10 Jahren bekannt geworden, daß das Kation Lithium die Funktion endokriner Organe beeinflußt oder die periphere Hormonwirkung modifiziert. Gezielte neuere physiologisch-chemische und pharmakologische Untersuchungen haben ergeben, daß neben Störungen des hormonal gesteuerten Wasser- und Elektrolythaushaltes (ROSENSWEIG 1967) Interferenzen mit der Funktion der Schilddrüse (SEDVALL et al. 1969), der Nebennierenrinde (HALMI et al. 1972) und des Nebennierenmarks (FANN et al. 1972) und Modifikationen des endokrin beeinflußten Kohlehydrat- und Lipidstoffwechsels (VENDSBORG 1976) zu beobachten sind.

Diese vielseitigen Wirkungen sind nur über eine zentrale Veränderung der Hormonwirkung erklärbar. Hinsichtlich des Angriffspunktes von Lithium im Bereich des Endokriniums wird deshalb heute vermutet, daß das Kation das für die eigentliche Hormonwirkung notwendige örtliche Milieu (Microenvironment) verändert und/oder durch Blockierung der hormonalen Aktivierung des Schlüsselenzyms Adenylcyclase oder durch Interferenz mit dem physiologischen Substrat cAMP (cyclisches 3,5-Adenosinmonophosphat) wirksam wird.

Der erste und bisher klinisch bedeutsamste Hinweis für die wichtige Rolle des Lithiums bei der Beeinflussung von Hormonwirkungen wurde durch die Beobachtung einer Strumaentwicklung (SCHOU 1968) und später einer Hypothyreose (BERENS u. WOLFF 1975) als Nebenwirkung bei einem kleinen Teil von Patienten erhalten, die aus psychiatrischer Indikation zur Behandlung von Manien Lithiumsalze erhielten. Das Auftreten dieser Nebenwirkungen stand dabei in der Regel nicht in einem Zusammenhang mit dem Therapieerfolg bei der psychiatrischen Grundkrankheit. Die genannten

klinischen Beobachtungen führten zu einer großen Zahl experimenteller Untersuchungen der Schilddrüsen-Pathophysiologie unter Lithiumeinfluß. Angeregt durch solche zufälligen klinischen Einzelbeobachtungen der Lithiumwirkung auf die Schilddrüsenfunktion und Morphologie und durch die oben skizzierten neueren biochemischen und pharmakologischen Erkenntnisse der letzten Jahre über den Angriffspunkt von Lithium im Bereich des Endokriniums wurde in der Marburger Endokrinologischen Arbeitsgruppe unabhängig und gleichzeitig mit ähnlichen Bemühungen von TEMPLE u. Mitarb. in den USA die Lithiumwirkung bei Überfunktionszuständen der Schilddrüse therapeutisch auszunutzen versucht.

Trotz der überraschenden ersten klinischen Therapieerfolge bei schweren Hyperthyreosen scheint jedoch die Sicherung der Befunde und die Aufklärung zunächst noch hypothetischer Annahmen über den Wirkungsmechanismus erforderlich, bevor Lithium als neues therapeutisches Prinzip im speziellen Fall der Thyreotoxikose und möglicherweise allgemein zur Beeinflussung weiterer endokriner Überfunktionszustände beim Menschen eingesetzt werden kann. Das Ziel dieser Arbeit soll es sein, über ein in die Therapie bereits eingeführtes Prinzip (Anwendung von Lithiumsalzen bei psychiatrischen Erkrankungen) weitere Daten über das Ausmaß der Nebenwirkungen im Bereich des Endokriniums, speziell der Schilddrüse und der Nebennierenrinde, zu erhalten. Es wird weiter erwartet, daß durch die Abklärung der über verschiedene Mechanismen vermittelten Lithiumwirkung möglicherweise neue therapeutische Ansätze für endokrine Erkrankungen erbracht werden können, wenn geklärt wird, über welche Mechanismen das Kation Lithium kurzzeitig und bei Langzeitanwendung seine Wirkung auf die Funktion endokriner Organe entfaltet.

Durch gezielte Versuchsansätze, die in der Versuchsplanung und im methodischen Teil der Arbeit beschrieben werden sollen, ist beabsichtigt, für die Schilddrüsenfunktionsänderung unter Lithium folgende spezielle Fragen zu beantworten.

1. Kann eine über das cAMP-System vermittelte, durch TSH-induzierte Hyperthyreose hinsichtlich ihres Stoffwechseleffektes durch Lithium modifiziert werden.

2. Wie verhalten sich Gesamt-T_4 und cAMP-Gehalt im Blut wachsender Ratten bei TSH-induzierter Hyperthyreose und läßt sich durch Lithiumgabe eine Änderung der Parameter erreichen.

3. Wie verhält sich das Schilddrüsengewicht unter TSH-Stimulation unter gleichzeitiger Lithiumgabe.

4. Kann eine durch artefizielle T_4-Intoxikation gesetzte Hyperthyreose hinsichtlich ihres Stoffwechseleffektes durch Lithium modifiziert werden.

Hinsichtlich des Einflusses von Lithium auf die Nebennierenrinde sollen im zweiten Teil dieser Arbeit eigene Untersuchungen von zwei bereits vorliegenden Ergebnissen anderer Untersucher ihren Ausgang nehmen. 1972 haben HALMI u. Mitarb. die Nebennierenrindenfunktion bei gesunden Freiwilligen untersucht. Sie fanden eine Nivellierung des circadianen Rhythmus des Plasmacortisolspiegels. Nach Dexamethasonsuppression war die Ansprechbarkeit auf Synacthen unverändert. Sie schlossen daraus, daß der Angriffspunkt von Lithium außerhalb der Nebennierenrinde im Regelsystem zu lokalisieren sei. In experimentellen Versuchen von KRULIK (1970) wurde im Kurzzeitversuch eine vorübergehende Steigerung der Aldosteronproduktion aus 4-$_{14}$ C Progesteron in Nebennierenschnitten Lithium vorbehandelter Ratten nach 3 Tagen

gesehen. Die glucocorticoide Partialfunktion schien nach 10-tägiger Lithiumbehandlung weder nach morphologischen noch nach funktionellen Kriterien beeinträchtigt. Bei weiterer Durchsicht der Literatur zu diesem Problem scheint es unter Lithium ähnlich wie an anderen endokrinen Organen unspezifisch toxische und spezifischere Wirkungen zu geben, die schon bei niedrigeren Dosierungen zu beobachten sind als erstere. Unterschiedliche Resultate scheinen sich auch dann zu ergeben, wenn die Untersuchungen unter Basalbedingungen,im supprimierten oder stimulierten Zustand vorgenommen werden.

Bei diesem derzeitigen Stand der Untersuchungen schien es uns unbedingt erforderlich, abzuklären, inwieweit eine Lithiumapplikation zu nur vorübergehenden Funktionsänderungen der Nebenniere führt oder ob mit dauernden morphologischen und funktionellen Abweichungen zu rechnen ist. Zur Lösung dieser Frage wurden deshalb weitere gezielte Versuche durchgeführt, bei denen im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv bei Ratten die Kurzzeit- und Langzeitwirkung von Lithium auf die Nebennierenrindenfunktion vor und nach ACTH-Stimulierung untersucht werden soll. Als Parameter dienen dabei die Nebennierengewichte, die lichtmikroskopische Morphologie der Nebennierenrinde, die peripheren Spiegel von Corticosteron und cAMP sowie der Corticosterongehalt im Gewebe der Nebennieren.

1. Lithium und die Schilddrüse

Literaturübersicht über klinische und tierexperimentelle Befunde

Erste Hinweise auf eine Beeinflussung des Endokriniums durch das Kation Lithium ergaben sich aus den Beobachtungen über die Entwicklung einer reversiblen Struma mit oder ohne Hypothyreose bei manisch-depressiven Patienten, bei denen eine Therapie mit Lithiumsalzen durchgeführt wurde (SCHOU 1968).

Aus Studien an über 1100 psychiatrischen Patienten ergab sich eine Strumainzidenz von 3,1% (BERENS u. WOLFF 1975). In der Regel handelte es sich um relativ kleine diffuse Schilddrüsenvergrößerungen, noduläre Formen waren eher selten.

Über die Dauer der Lithiumtherapie bis zur Entwicklung einer Struma liegen unterschiedliche Angaben vor. GERDES et al. (1973) berichteten bei einer hyperthyreoten Struma über ein deutliches Wachstum bereits nach 3-wöchiger Gabe von Lithiumsalzen. In der Regel entwickelte sich die Schilddrüsenvergrößerung jedoch in einem Zeitraum von 5 Monaten bis zu 2 Jahren nach Beginn der Lithiumtherapie; nach Beendigung der Applikation bildete sie sich innerhalb von 2-3 Monaten wieder zurück (SCHOU et al. 1968).

Daneben berichteten BERENS u. WOLFF (1975) über 60 Fälle mit Entwicklung eines Myxödems, die zeitlich eng korreliert war mit einer Lithiumexposition. Hinsichtlich ihrer klinischen Manifestationen und der Laborparameter ähnelten diese lithiuminduzierten Hypothyreosen der primären Hypothyreose; häufig waren sie mit einer Struma vergesellschaftet (SHOPSIN et al. 1969, LAUTER 1971). Bei allen Patienten lagen dabei die Serum-Lithiumspiegel im therapeutischen Bereich von 0,6-1,2 mVal/l, so daß eine

Korrelation von Inzidenz und Schwere der Schilddrüsenerkrankung mit den Konzentrationen des Kations im Serum nicht vorgenommen werden konnte.
Im Gegensatz zur primären Hypothyreose fanden sich bei diesen Patienten ein normaler oder erhöhter ^{131}-J-uptake (SEDVALL et al. 1968, VESTERGAARD u. POULSEN 1972, CROWE et al. 1973).

Thyreoidale Radiojodaufnahmen, die entweder abnorm hoch oder jedenfalls signifikant über den Werten vor Beginn der Lithiumtherapie lagen, fanden sich auch bei einigen Patienten, die klinisch euthyreot waren. (SCHOU et al. 1968, SEDVALL et al. 1969). Viele Patienten zeigten aber auch oft nur vorübergehende Veränderungen bei Funktionsuntersuchungen der Schilddrüse. So fanden sich unter Lithium ein Anstieg der Serum-TSH-Spiegel ohne signifikante Veränderungen der peripheren Thyroxinspiegel (EMERSON et al. 1973, LINDSTEDT et al. 1973). COOPER u. SIMPSON (1969) fanden darüber hinaus ein erniedrigtes PBJ und einen Abfall des freien T_4 mit einem Maximum 10-14 Tage nach Beginn der Lithiumeinnahme. Trotz Fortsetzung der Therapie stiegen diese Werte aber nach 3 Monaten wieder in den subnormalen Bereich an (COOPER u. SIMPSON 1969, HALMI u. NOYES 1972).

Der Angriffspunkt von Lithium im Jodstoffwechsel der Schilddrüse konnte klinisch nicht geklärt werden, obwohl SEDVALL et al. schon 1968 eine Blockierung der Hormonsekretion aus der Schilddrüse postulierten, um die gesteigerte ^{131}-J-Aufnahme erklären zu können.

Im Tierversuch konnte jedoch zumindest an hypophysektomierten Ratten, denen TSH substituiert wurde, gezeigt werden, daß der antithyreoidale Effekt des Lithium nicht über die Hypophyse vermittelt war (BERENS et al. 1970).

Die strumigene Wirkung anderer Thyreostatika wurde durch gleichzeitige Lithiumgabe verstärkt (MÄNNISTÖ et al. 1971). Im Lithiumlangzeitversuch fanden BERENS et al. (1970) eine Reduktion der thyreoidalen ^{131}-Jodfreisetzungsrate bei Ratten. Da die Schilddrüsenhormonsekretion TSH-abhängig ist, wurde vermutet, daß Lithium möglicherweise über eine Blockierung der hormonalen Aktivierung des Schlüsselenzyms Adenylcyclase oder Interferenz mit dessen physiologischem Substrat, dem 3', 5'-cyclo AMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), wirksam sein könnte (WOLFF et al. 1970).

Seitdem BIRNBAUMER et al. (1969) zum erstenmal zeigen konnten, daß durch Lithium das in der Zellmembran lokalisierte Enzym Adenylcyclase gehemmt werden konnte, wurde dieser Mechanismus immer wieder diskutiert, da die Aktivierung dieses Enzyms für die Übermittlung der hormonalen Information auf die Zelle im sogenannten 'second messenger' System eine wesentliche Bedeutung hat (SUTHERLAND et al. 1965, ROBISON 1968, GREENGARD u. ROBISON 1973). Das Ausmaß der Hemmwirkung des Lithium konnte durch gleichzeitige Reduktion von Magnesiumionen noch verstärkt werden (WOLFF et al. 1970). Eine Erklärung der Lithiumwirkung über diesen Mechanismus allein ist jedoch nicht möglich (s.u.), da Lithium zusätzlich zu einer Veränderung des Micromilieus an der Hormonrezeptorseite führt; der Interferenz des Lithium mit Magnesiumionen bei der Bindung an Plasmamembranen scheint die wichtigste Bedeutung zuzukommen (WOLFF et al. 1970).

Aufgrund unterschiedlich hoher oder zum Teil in der Literatur nicht angegebener Serum-Lithiumkonzentrationen sind jedoch die Befunde aus tierexperimentellen Untersuchungen gerade wegen der sich scheinbar widersprechenden Ergebnisse schwer zu beurteilen. Grundsätzlich muß jedoch, da die Lithiumwirkung zum Teil dosisabhängig ist, differenziert

werden zwischen akuten toxischen unspezifischen Effekten bei hohen Dosen und chronischen spezifischen Wirkungen, die sich auch bei niedriger Dosierung (0,6-1,2 mVal/l) über längere Zeit hin entwickeln wie in der vorgelegten Untersuchung.

2. Lithium und die Nebennierenrindentätigkeit

Literaturübersicht über klinische und tierexperimentelle Befunde

Über einen Einfluß von Lithium auf die Nebennierenrinde ist bisher noch viel weniger bekannt als über seine Wirkung auf die Schilddrüse. Da die Schilddrüse mehr als alle anderen Organe - Knochen ausgenommen - Lithium anreichert, wobei die intrathyreoidalen Lithiumspiegel 2,5-5 mal höher liegen als gleichzeitig bestimmte Serumspiegel (SCHOU et al. 1968, BERENS et al. 1970), treten Nebenwirkungen an ihr möglicherweise früher und ausgeprägter ein als an anderen endokrinen Organen.

Eine Therapie mit Lithiumsalzen scheint aber dennoch Veränderungen im Steroidstoffwechsel zu bewirken, wobei wie an der Schilddrüse akute und chronische, sich scheinbar widersprechende Effekte zu unterscheiden sind.

Schon ohne eine Medikation wurden bei Patienten mit affektiven Psychosen Veränderungen der glucocorticoiden sowie der mineralocorticoiden Partialfunktionen der Nebenniere beobachtet, die oft den Phasen der Grundkrankheit zugeordnet werden konnten (RIZZO et al. 1954, GIBBONS 1964, BRAMBILLA u. NUREMBERG 1963, BUNNEY et al. 1965, SCHWARTZ et al. 1966, BROOKSBANK u. COPPEN 1967, SACHAR et al. 1970, 1972). Es lag daher nahe, den therapeutischen Effekt von Lithium mit seinem eventuellen Einfluß auf die Nebennierenrindenaktivität zu korrelieren.

Wie Thyreotropin auf die Schilddrüse überträgt das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) des Hypophysenvorderlappens seine Wirkung auf die Nebennierenrinde zum Teil über das 'second messenger system' des cyclischen AMP (GRAHAME-SMITH et al. 1967, MOYLE et al. 1973, COTE et al. 1975, RICHARDSON et al. 1975, WHITLEY et al. 1975), so daß auch

an diesem Punkt ähnlich wie an der Schilddrüse eine Störungsmöglichkeit der Nebennierenrindenaktivität gegeben ist. Schließlich könnte schon allein durch die von Lithium induzierte Veränderung der Schilddrüsenfunktion eine Reaktion der Nebennierenrinde ausgelöst werden.

Wegen der kaum möglichen Trennung direkter und indirekter Lithiumwirkungen bei psychotischen Patienten untersuchten HALMI et al. (1972) die Nebennierenrindenfunktion unter Lithium bei gesunden Freiwilligen. Sie fanden eine Nivellierung des circadianen Rhythmus der Plasmacortisolspiegel; nach Dexamethasonsuppression war die Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde nach 30 und 60 Min. im ACTH-Test mit 0,25 mg Synacthen^{R} unverändert; daher vermuteten HALMI et al. den Angriffspunkt von Lithium außerhalb der Nebenniere im Regelsystem.

Im Tierversuch mit Ratten fand KRULIK (1970) nach Applikation von 2 mMol Lithium/kg/die nach 10 Tagen im Gewicht der Nebennieren, ihrem Cholesteringehalt und den Corticosteronspiegel in Serum und Urin keine Veränderungen. In einer ähnlichen Versuchsanordnung fand derselbe Autor jedoch (1971) bei einer Dosierung von 2,5 mMol LiCl/kg s.c. zweimal täglich bereits nach 3 Tagen einen signifikanten Anstieg des Nebennierengewichts um 34% und eine Erhöhung der Aldosteronproduktion der Nebennieren aus 4-$^{14}_{}$C Progesteron um 131% und berechnet auf 100 mg Gewebe um 80,8%.

Wie oben schon erwähnt, scheint es an der Nebenniere unspezifische toxische und spezifische Wirkungen zu geben, die schon bei niedrigeren Dosierungen zu beobachten sind als erstere; unterschiedliche Resultate scheinen sich auch dann zu ergeben, wenn die Untersuchungen unter Basalbedingungen,im supprimierten oder stimulierten Zustand vorgenommen werden.

II. Eigene experimentelle Untersuchungen

Material und Methodik

1. Versuchsansätze

Für die Untersuchungen des Einflusses von Lithiumchlorid auf die Schilddrüsen- bzw. Nebennierenrindenfunktion wurden jeweils 22 männliche weiße Wistarratten (Institut für Versuchstierzucht Hannover) mit einem Gewicht zwischen 120 und 150 g in 4 Gruppen eingeteilt.

TSH-/T_4 - Versuch:

1) Gruppe I (n=6) bekam 5 USP TSH/die s.c.
Gruppe II (n=6) bekam 5 USP TSH/die s.c. + LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser = 2,5 mVal/kg/die
Gruppe III (n=6) erhielt nur LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser
Gruppe IV (n=4) diente als Kontrollgruppe

2)a. Gruppe I (n=6) erhielt 10 mg Thyroxin/100 g KG/die p.os
Gruppe II (n=6) erhielt 10 mg Thyroxin/100 g KG/die p.os + LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser
Gruppe III (n=6) erhielt nur LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser
Gruppe IV (n=4) diente als Kontrollgruppe

b. Zur Bestimmung der Überlebensrate bei artefizieller Thyroxinintoxikation wurden 40 Ratten in zwei gleichgroße Gruppen aufgeteilt.

Gruppe I (n=20) erhielt 10 mg Thyroxin/100 g KG/die p.os

II (n=20) erhielt 10 mg Thyroxin/100 g KG/die p.os + LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser

ACTH-Versuch:

Gruppe I (n=6) bekam 10 IU ACTH (Synacthen-Depot)/2 dies s.c.

II (n=6) bekam 10 IU ACTH/2 dies s.c. + LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser

III (n=6) erhielt nur LiCl 7 mVal/l im Trinkwasser

IV (n=4) diente als Kontrollgruppe

Alle Tiere erhielten Standardtrockenfutter (Fa. Altromin) und Trinkwasser ad libitum, ihr Gewicht und der Trinkwasserverbrauch wurden alle 2 Tage gemessen.

Nach 52 Tagen (TSH-Versuch) bzw. 10 Tagen (T_4-Versuch a) bzw. 17 Tagen (ACTH-Versuch) wurden die Tiere im Ätherrausch getötet, die freie Bauchhöhle und der Thorax eröffnet und Blut sowie die Schilddrüsen und Nebennieren entnommen.

Das im Eis bei 0°-4° C mit Na_2-EDTA abgenommene Blut wurde sofort 5 Min. bei 0°-4° C mit 5000 Upm zentrifugiert (Sorvall, RC 2), das Serum abgehoben, in Eppendorffhütchen portioniert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert.

Die von Fett- und Bindegewebe freipräparierten Organe wurden gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung einzeln bei -80° C gelagert. Ein Teil der Organe aus jedem Kollektiv wurde in Formalin fixiert, um Schnittfärbungen anzufertigen. Paraffineinbettung in üblicher Weise, Schnittherstellung (5 µ) und anschließend H.E.-Färbung sowie Lipidfärbung bei den Nebennieren.

Für die Versuchsreihe mit TSH wurden im Serum Gesamtthyroxin (T_4), NTR sowie 3', 5'-cyclo AMP bestimmt; von den entnommenen Schilddrüsen wurden H.E.-Färbungen angefertigt; die Gesamtthyroxinspiegel wurden ebenfalls bei den einzelnen Kollektiven der T_4-Versuche bestimmt.

Für die Versuchsreihe mit ACTH wurden im Serum 3', 5'-cyclo AMP und Corticosteron bestimmt; zusätzlich wurde mit einer neu entwickelten Extraktionsmethode der Corticosterongehalt der Nebennieren bestimmt. Von einem Teil der Organe wurden H.E. und Lipidfärbungen angefertigt. Die flammenphotometrische Bestimmung der Serumlithiumkonzentrationen ergab Werte im therapeutischen Bereich von 0,4-0,8 mVal/l.

2. Serumbestimmungen

a) 3', 5'-cyclo Adenosinmonophosphat (cAMP)

3', 5'-cAMP wurde mit der Proteinbindungsmethode nach TOVEY et al. (1974) (cyclic AMP assay kit, Amersham/Buchler, Braunschweig) bestimmt.
Versuche mit der radioimmunologischen Methode nach STEINER et al. (1972) (cAMP RIA, Schwarz / Mann-Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) ergaben absolut um etwa 10-15% niedrigere Werte, die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Tierkollektiven waren jedoch identisch. Bei der Methode nach TOVEY et al. konnte jedoch auf eine Extraktion des cAMP mit Perchlorsäure und die anschließend erforderliche chromatographische Aufarbeitung über Aluminiumoxidsäulchen verzichtet und cAMP im Serum direkt bestimmt werden.

Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsmethode

Die Methode beruht auf der kompetitiven Bindung von (8-^{3}H) Adenosin 3', 5'-cyclo AMP und endogenem 3', 5'-cyclo AMP um eine begrenzte Anzahl Bindungsstellen an einem zu cAMP hochaffinen spezifischen Protein. Als limitierender Faktor wird das Protein mit einem Probenansatz gemischt, der das zu bestimmende cAMP sowie eine definierte Menge tritiummarkierten cAMPs enthält. Während einer festgelegten Inkubationszeit bildet sich ein Gleichgewicht zwischen markiertem Substrat-Protein-Komplex und unmarkiertem Substrat-Protein-Komplex. Radioaktiv markiertes und unmarkiertes 3', 5'-cyclo AMP konkurrieren mit denselben aktiven Bindungsstellen an dem spezifischen Protein. Dabei ist die Menge an unmarkiertem cAMP-Protein-Komplex umgekehrt proportional der Menge an markierten Komplex. Aus der Messung der proteingebundenen Radioaktivität läßt sich direkt die Konzentration an endogenem cyclo AMP berechnen, nachdem das System mit bekannten Konzentrationen an unmarkiertem cAMP geeicht worden ist.

Die Trennung von proteingebundenem cyclischen AMP vom nichtgebundenen Anteil des Nukleotids nach 2-stündiger Inkubation bei 0°-4° C wird erreicht durch die Adsorption des freien Nukleotids an eine coated Charcoal Lösung und anschließender Zentrifugation.
Ein Aliquot des Überstandes wird zur Flüssigkeitsszintillationsmessung abgehoben, die Konzentration an unmarkiertem endogenen cAMP kann anschließend an einer linear verlaufenden Standardkurve abgelesen werden.

Eine für den benutzten cyclo AMP assay kit typische Eichkurve zeigt Abb. 1.

Sie wird konstruiert, indem man C_o/C_x (y-Achse) gegen die Konzentration an unmarkiertem Nukleotid (x-Achse) auf linearem Millimeterpapier aufträgt. C_o entspricht der gebundenen Radioaktivität in Abwesenheit von unmarkiertem cAMP, C_x der gebundenen Aktivität in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Standardsubstanz.

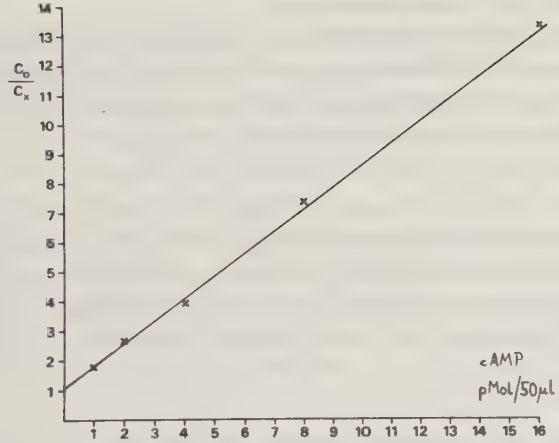

Abb. 1, 3',5'-cyclo AMP Eichkurve

Alle zur Bestimmung von cyclischem AMP benutzten Reagentien waren gefriergetrocknet und enthielten nach Lösung in aqua bidest. 50 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA bei einem pH von 7,5.
Die Blutproben wurden zu 1% ihres Volumens mit 0,5 M EDTA, pH 7,5 versetzt. EDTA diente gleichzeitig als Antikoagulans wie auch als Phosphodiesterase Hemmer und verhinderte damit auch einen enzymatischen Abbau bei einer Lagerung der Seren bei -20° C.

Das spezifische Bindungsprotein zur cAMP Bestimmung nach TOVEY et al. wurde aus frischer Skelettmuskulatur von Rindern gewonnen, gereinigt und durch Rinder-Serum-Albumin aktiviert. Die spezifische Aktivität betrug 0,1 pMol gebundenes cAMP/µg Bindungsprotein.
Als markiertes Nukleotid wurde tritiiertes cyclisches AMP, (8-^{3}H) Adenosin 3', 5'-Monophosphat benutzt und zwar 180 pMol (ca. 5 µCi) in 10 ml des oben beschriebenen Tris/EDTA Puffers (äquivalent zu 16 pMol/50 µl Ansatz).

Zur Erstellung der Eichkurve wurden 1600 pMol nicht-radioaktiv markiertes cyclisches AMP in 5 ml Puffer gelöst, entsprechend 16 pMol cAMP/50 µl Ansatz. Hiervon wurden vier fortlaufende Verdünnungen als Eichstandards hergestellt, die jeweils 8, 4, 2 und 1 pMol cAMP/50 µl Probe enthielten.

Als Adsorbens zur Trennung dienten 520 mg Norit GSX Charcoal in 20 ml Puffer, der 2% Rinder-Serum-Albumin enthielt.

Das Volumen jeder Probe betrug einschließlich der Kohlesuspension 300 µl. bestehend aus 50 µl Eichlösung, 50 µl tritiiertem cAMP und je 100 µl Proteinlösung und Kohlesuspension.

Zur Blankwertbestimmung wurden 150 µl Puffer mit 50 µl (H_3)-cAMP inkubiert und mit 100 µl Charcoallösung versetzt. Die im Blank gefundene Radioaktivität wurde von der gemessenen Radioaktivität aller anderen Proben substrahiert. Alle Proben wurden doppelt angesetzt, alle Versuchsschritte einschließlich der Zentrifugation liefen bei 0°-4° C ab.

b) Gesamtthyroxinbestimmung und Normal Thyroxin Ratio (NTR)

Die direkte Gesamtthyroxinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse nach MURPHY u. PATTEE (1966).

Testprinzip T_4

Zur Beurteilung der Schilddrüsenfunktion ist die Kenntnis der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im peripheren Blut erforderlich. Da das Schilddrüsenhormon Thyroxin (T_4) im Serum fast vollständig an Trägerproteine gebunden ist, muß es zunächst durch Extraktion mit 96% Äthanol freigesetzt werden.
Dieser Extrakt wird einer Lösung Thyroxin-Binding-Protein (TBG) zugesetzt, bei dem die Bindungsstellen des TBG vorher nahezu vollständig mit einer Tracermenge markierten Thyroxins abgesättigt wurden. Extrahiertes Serum-T_4 konkurriert mit dem radioaktivmarkierten T_4 um die endliche Zahl der Bindungsstellen am TBG und verdrängt die markierte Tracermenge proportional zu seiner Konzentration aus der TBG-Bindung.
Nach Eichung des Systems mit bekannten Konzentrationen an inaktivem Thyroxin kann aus der verdrängten Radioaktivität die T_4-Konzentration in einer Untersuchungsprobe errechnet werden. Zur Trennung gebundenen und ungebundenen T_4s verwendet man ein Adsorptionsmittel (Granulat), das eine reversible Bindung von T_4 erlaubt. Nach einer definierten Inkubationszeit (30 min) läßt

man das Granulat absetzen und mißt die Radioaktivität eines Aliquots der überstehenden Lösung.
Die Thyroxin Konzentration einer unbekannten Probe wird aus einer Eichkurve abgelesen (Abb. 2).

Prinzip der Normal Thyroxin Ratio (NTR)

Da Veränderungen des TBG-Spiegels auch die T_4-Konzentration beeinflussen können, erfordert die Beurteilung der Thyroxin-Werte auch die Kenntnis der Konzentration der Trägerproteine. Daher ermittelt man die freie Bindungskapazität des TBG für T_4; durch Vergleich mit einem euthyreoten Poolserum bestimmt man den Normalisierten Thyroxin Quotienten (Normal Thyroxin Ratio, NTR).

Der Normalisierte Thyroxin Quotient wird nach Entnahme der Aliquots für die Radioaktivitätsmessung bei der Gesamtthyroxinbestimmung ermittelt, indem dem Reaktionsansatz ein Aliquot einer nicht mit Äthanol extrahierten Serumprobe zugegeben wird, das sowohl TBG, als auch daran gebundenes Schilddrüsenhormon enthält. Die noch freien TBG-Bindungsstellen können nun weiteres markiertes und unmarkiertes Thyroxin abfangen und damit dessen Bindung an das Adsortionsgranulat verhindern. Entsprechend erhöht sich die Radioaktivität im Überstand der Testprobe.
Die NTR-Meßprobe wird nach einer Inkubationszeit von 30 min aus dem Überstand abgehoben, die Zählrate der unbekannten Proben auf die eines mitgeführten Standardserums bezogen und daraus der NTR errechnet.

Zur Gesamtthyroxinbestimmung und zur Bestimmung der NTR wurde der Thyropac-5-Kit der Fa. Amersham/Buchler benutzt. Die verwendeten Humanstandardseren waren gefriergetrocknet und enthielten nach Auflösung in

1 ml aqua bidest. 1 bzw. 10 µg T_4/100 ml für die Gesamt-T_4-Bestimmung, der NTR-Faktor des Standards für die Bestimmung des Normalisierten Thyroxin Quotienten lag bei etwa 1,00.
Daneben wurde für jeden Bestimmungsansatz eine Testprobe mit Thyroxin-Binding-Globulin, Pufferlösung, Adsorptionsgranulat und L-Thyroxin (125-J) benutzt, deren Aktivität bei etwa 0,3 µCi Jod-125 lag.

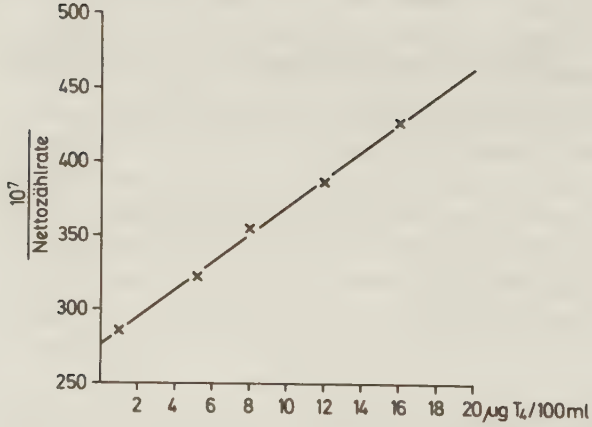

Abb. 2 Eichgerade für die Thyroxinbestimmung

Für jedes Standardserum und für jede unbekannte Probe wird $\frac{1}{C} = \frac{10^7}{\text{Nettozählrate}}$ errechnet (Nettozählrate=Impulse-Nulleffekt). Die Eichgerade wird erstellt, indem die $\frac{1}{C}$ – Werte der Standardseren gegen ihre T_4-Werte (µg/100 ml) in ein Koordinatensystem eingetragen werden. Die beiden Punkte werden durch eine Gerade verbunden, die $\frac{1}{C}$ – Werte der unbekannten Seren auf der Eichgeraden aufgesucht und die dazu gehörenden T_4-Werte auf der Waagrechten abgelesen.

Der NTR-Werte der unbekannten Probe =

$\frac{\text{Imp. NTR-Standard}}{\text{Imp. unbekanntes Serum}}$ x NTR-Faktor des Standards

c) Corticosteron

Corticosteronextraktion aus Serum

Die Extraktion der Plasmaproben für die radioimmunologische Corticosteronbestimmung erfolgte nach der leicht abgewandelten Methode nach VESCEI (1974).

Die Extraktionsschritte sind schematisch aus Abb. 3 ersichtlich. Zur Messung der Wiederfindung wurden jeder Probe 1500 cpm 1,2,6,7-^{3}H-Corticosteron zugesetzt; die im Radioimmunoassay bestimmten Werte wurden auf 100% umgerechnet.

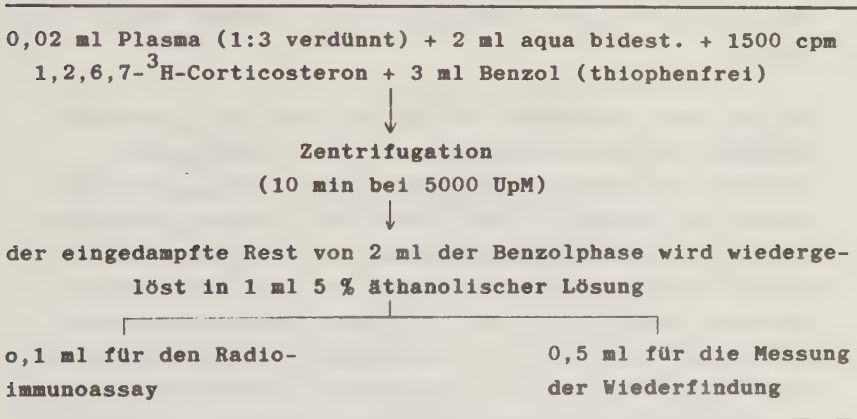

Abb. 3 Extraktion von Corticosteron aus Plasma, abgeändert nach P. VESCEI

Anschließend an die Extraktion wurde das Corticosteron radioimmunologisch in leicht abgewandelter Form nach der von GOMEZ-SANCHEZ, MURRY et al. (1975) beschriebenen Methode bestimmt.

Prinzip des Radioimmunoassays

Der Assay basiert auf der Kompetition zwischen unmarkiertem endogenen Corticosteron und einer definierten Menge radioaktiv markiertem Corticosteron um die Bindung an ein Antiserum, das eine hohe Spezifizität und Affinität zu Corticosteron besitzt. Prinzipiell besteht Analogie zur oben beschriebenen Proteinbindungsmethode für cyclisches AMP. Nur bildet sich im RIA (Radioimmunoassay) kein Substrat-Protein-, sondern ein Antigen-Antikörper-Komplex, wobei markiertes bzw. endogenes Corticosteron das Antigen darstellen. Die Trennung freien und gebundenen Corticosterons wird erreicht durch Adsorption des freien Steroids an eine Dextran-Kohle-Lösung und anschließende Zentrifugation.

Der im Assay verwendete Antikörper wurde von Kaninchen gewonnen, die gegen Corticosteron -21- Hemisuccinat - Rinder-Serum-Albumin immunisiert worden waren; der Antikörpertiter betrug 1/10000. Der Corticosteron Antikörper wurde in 0,05 M Boratpuffer, pH 7,8, überführt, der in 100 ml 0,5% Bovine-Serum-Albumin und 0,1% Human-Gamma-Globulin enthielt. In der Antikörper Verdünnungsreihe zeigten sich die besten Resultate der Antigen-Antikörper-Komplex Bildung bei 5 µl Antikörper in 30 ml Boratpufferlösung (Abb. 4), entsprechend einer Verdünnung 1/6000. Hiervon wurden 300 µl im Assay eingesetzt.

Als radioaktiv markiertes Antigen wurde 1,2,6,7-^{3}H-Corticosteron in Äthanol p.A. gelöst; 10 µl entsprachen 13000 cpm.

Zur Erstellung der Eichkurve wurde Corticosteron in 5% Äthanollösung eingebracht und so verdünnt, daß im Assay 100 µl Standardlösung 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 pg Corticosteron enthielten.

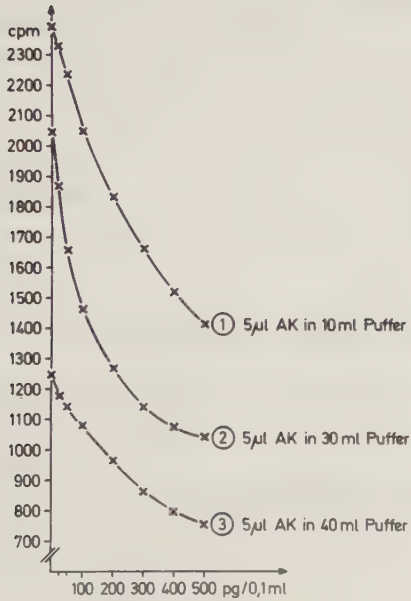

Abb. 4 Corticosteron Antikörper Verdünnungsreihe
1) 5 µl AK/10 ml Boratpufferlösung
2) 5 µl AK/30 ml Puffer
3) 5 µl AK/40 ml Puffer

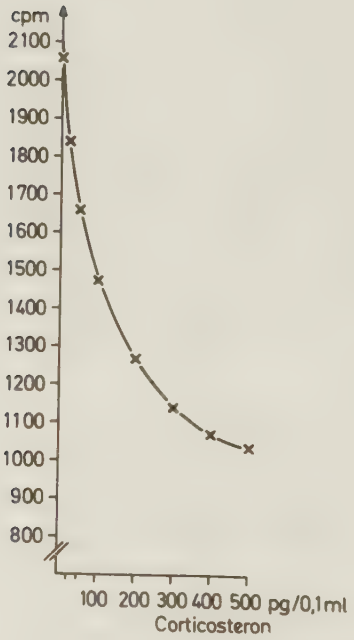

Abb. 5 Corticosteron Eichkurve

Die immer doppelt angesetzten Proben, bestehend aus 10 µl H_3-Corticosteron, 100 µl Standardlösung bzw. Serumextrakt und 300 µl Antikörperlösung wurden 1 Stunde im Wasserbad bei 37° C und anschließend 1 Stunde im Eis bei 0°-4° C inkubiert. Eine verlängerte Inkubation bei allein 0°-4° C über 24 Stunden brachte keine veränderten Ergebnisse.

Die an den Antikörper gebundene Fraktion wurde adsorbiert an 600 µl einer Kohle Suspension, die in 100 ml 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 125 mg Norit A und 125 mg Dextran enthielt. Nach abschließender Inkubation (10 min) im Eis wurde 15 min mit 5000 Upm bei 0°-4° C zentrifugiert (Christ Kühlzentrifuge) und 500 µl des Überstandes zur Messung der Antikörper-gebundenen Radioaktivität in Szintillationsgefäße überführt.
Abb. 5 zeigt die für den Corticosteron RIA typische Standardkurve.

3. Gewebebestimmung

Corticosteron

Extraktion von Corticosteron aus Nebennierengewebe

40-50 mg gefrorenen Nebennierengewebes wurden im Eis bei 0°-4° C in 1 ml eiskaltem aqua bidest. mit einem Glaspotter homogenisiert.
Das Homogenat wurde in Spitzkolben mit 25 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) versetzt und 10 min mit einem Schüttler (Fa. Köttermann) ausgeschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert (Christ Tischzentrifuge) und teilte sich in eine wässrige Phase, eine schmale Schicht fester Bestandteile (denaturiertes Protein, Lipide etc.) und eine untere Dichlormethanphase.

Die Dichlormethanphase, die das gesuchte Steroid enthielt, wurde mit einer Kapillarpipette abgesaugt und über einen Phasentrennfilter (Whatman 1 PS) auf eine Kieselgelsäule gegeben und zur Abtrennung störender Steroide nach der unten entwickelten Methode chromatographiert.

Das Eluat der letzten chromatographischen Fraktion (s.u.) wurde im Vakuumexsikkator eingedampft, die eingedampfte

Trockene in 5 ml 5% Äthanollösung wiedereingebracht und entsprechend der Eichkurve des oben beschriebenen Corticosteron Radioimmunoassays verdünnt und bestimmt.

Methode zur chromatographischen Abtrennung von Corticosteron aus Gewebeextrakten

Zur Abtrennung von Corticosteron aus Nebennierengewebe für den Corticosteron Radioimmunoassay wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, spezifisch störende Steroide der Nebenniere von dem zu bestimmenden Corticosteron zu isolieren. SCHEUER et al. (1976) haben eine Methode beschrieben, Testosteron und Aldosteron aus Serum und Urin mit Hilfe einer Silicagelsäulenchromatographie für die radioimmunologische Bestimmung zu extrahieren. Für die in der vorliegenden Arbeit relevante Fragestellung des Corticosterongehaltes der Nebennieren von Ratten, die mit Lithiumchlorid behandelt wurden, wurde aufbauend auf der Arbeit von SCHEUER et al. eine Silicagelsäule zur chromatographischen Extraktion von Corticosteron entwickelt.

Die chromatographisch abzutrennenden, die radioimmunologische Corticosteronbestimmung störenden Steroide des Nebennierengewebes ergaben sich aus der Bestimmung ihrer Kreuzreaktivität mit dem im Assay verwendeten Antikörper. Die Kreuzreaktivität des Corticosteron Antikörpers mit 11-Desoxycorticosteron, Cortisol, Aldosteron, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androsteron, Östradiol sowie Cholesterin und die daraus errechnete prozentuale Kreuzreaktivität zeigt Tab. 1.

Corticosteron	100
11-Desoxycorticosteron	62,5
Cortisol	14,28
Aldosteron	0,746
Progesteron	99
Dehydroepiandrosteron	0
Androsteron	0
Östradiol	0
Cholesterin	0

Tab.1 Kreuzreaktivität des Corticosteron Antikörpers

Die Werte sind in % Bindung angegeben; Antigen war Corticosteron-21-Hemisuccinat-Bovine Serumalbumin Komplex

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, daß zur Bestimmung des Gewebecorticosterons von den Steroiden der Nebennierenrinde vor allem die Abtrennung des 11-Desoxycorticosteron (im folgenden DOC) sowie des Progesteron erforderlich war. Obgleich Cortisol eine hohe Kreuzreaktivität von 14,28% aufwies, konnte dies vernachlässigt werden, da die Ratte ja bekanntlich Cortisol nur in sehr geringen Mengen produziert.

Dünnschichtchromatographische Trennung des Corticosteron von anderen Steroiden

Als Laufmittelgemisch wurde Benzol/Äthylacetat gewählt. Zur Austestung seiner Laufmitteleigenschaften wurden Steroide unterschiedlicher Polarität dünnschichtchromatographisch eluiert (BUSH, 1961, SCHEUER et al., 1976).

Cholesterin, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androsteron, Corticosteron, 11-Desoxycorticosteron, 11-Desoxycortisol, Cortisol, Aldosteron und Östradiol wurden im

Abstand von 2 cm mit einer 5 µl fassenden Mikropipette (Hamilton) auf Dünnschichtplatten (20x20 cm) aufgetragen und in einer dampfgesättigten Kammer mit dem Laufmittelgemischt Benzol/Äthylacetat im aufsteigenden System bei 25° C inkubiert.
Wenn die Laufmittelfront eine Höhe von 18 cm erreicht hatte, wurden die Platten aus der Kammer genommen, getrocknet und unter UV-Licht betrachtet. Da Progesteron unter Quarzlicht nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurden die Dünnschichtplatten mit einer Indikatorsubstanz besprüht, auf 80°-90° C erhitzt und unter Quarzlicht fotographiert.
Das Indikatorgemisch (RANDERATH, 1962) setzte sich zusammen aus 5 ml Acetanhydrid p.A. und 5 ml 97% Schwefelsäure in 50 ml Äthanol p.A.

Benzol/Äthylacetat im Verhältnis 70/30 gemischt ergab schon eine gute Abtrennung des Corticosteron von 11-Desoxycorticosteron (11-DOC), aber auch vor allem für Progesteron. Die Rf-Werte waren für Corticosteron 0,038, für 11-DOC 0,173 und für Progesteron 0,33 bei einer Gesamtlaufstrecke des Fließgemisches von 18,5 cm.

Wurde das Mischungsverhältnis zugunsten von Äthylacetat auf 40/60 verschoben, so verbesserte sich mit der veränderten Polarität des Fließmittels die Trennbarkeit der aufgetragenen Steroide deutlich, vor allem die von 11-DOC. Die Rf-Werte lagen jetzt für Corticosteron bei 0,194, für 11-DOC bei 0,405 und für Progesteron bei 0,536.

Eine detaillierte Darstellung der Rf-Werte der untersuchten Steroide hinsichtlich der verschiedenen Elutionsgemische ist aus Tabelle 2 zu entnehmen. Die Abbildungen 6 a und 6 b zeigen die dünnschichtchromatographische Trennung dieser Steroide für ein Mischungsverhältnis von Benzol/Äthylacetat von 70/30 bzw. 40/60.

Abb. 6 a, dünnschichtchromatographische Trennung von Steroiden mit Benzol/Äthylacetat im Mischungsverhältnis 70/30

	Benzol/Äthylacetat (22-26° C)	
	70/30	40/60
Cholesterin	0,35	0,57
Progesteron	0,33	0,56
Corticosteron	0,04	0,19
11-Desoxycorticosteron	0,17	0,4
Östradiol	0,29	0,52
11-Desoxycortisol	0,1	0,32
Hydrocortison	0,03	0,17
Aldosteron	0,02	0,08
Dehydroepiandrosteron	0,24	0,47
Androsteron	0,24	0,49

Rf - Werte der ausgetesteten Steroide in den benutzten Elutionsgemischen

Tab. 2, Gesamtlaufstrecke des Laufmittelgemisches 18,5 cm

Abb. 6 b, Trennung wie in Abb. 6 a, jetzt mit Benzol/Äthylacetat im Mischungsverhältnis 40/60

Präparation einer Silicagelsäule zur chromatographischen Extraktion von Corticosteron

Da sich die Corticosteronisolierung aus dem Nebennierengewebe mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie als zu aufwendig zeigte, wurde der Versuch unternommen, das Steroid über eine Silicagelsäule (SCHEUER et al., 1976) mit Benzol/Äthylacetat, das sich ja als potentes Elutionsgemisch erwiesen hatte, zu extrahieren.

Das konisch zulaufende untere Ende einer Glassäule (Länge 8,5 cm, Ø 0,5 cm) wurde mit 4 runden Scheiben Filterpapier (Whatman GF/D) verschlossen, um ein späteres Ablaufen des Gels und die damit verbundene Verunreinigung der Proben und eine Erhöhung des Blankwertes im RIA zu verhindern. Zur Präparation der stationären Phase wurde Bio Sil A, 250-325 mesh, in einem Gemisch Benzol/Äthylacetat 98/2 gelöst, und die Säule bis zu einer Höhe von 7 cm oberhalb der Filter bepackt (Abb. 7).

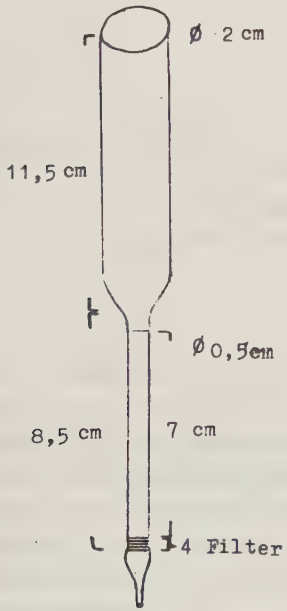

Abb. 7, Chromatographiesäule aus Glas

Auf die so vorbereitete Säule wurde über einen Phasentrennfilter Whatman 1 PS tritiummarkiertes Corticosteron, 11-DOC und Cortisol, gelöst in 25 ml Dichlormethan, gegeben, um in Vorversuchen die Wiederfindungsrate dieser Steroide nach verschiedenen Elutionsschritten bestimmen zu können.

Nach dem Durchlaufen der Dichlormethanphase wurde mit 25 ml Benzol/Äthylacetat in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen eluiert, das Eluat 2 ml-weise fraktioniert aufgefangen, davon je 1 ml in Szintillationsgefäße überführt und die Radioaktivität gemessen.

Bei Messung der eluierten Radioaktivität nach Elution mit Benzol/Äthylacetat 70/30 zeigte sich, daß der Peak für 11-Desoxycorticosteron bei 5 ml sein Maximum erreicht hatte und bei etwa 9 ml auf ca. 3% der eingesetzten Radioaktivität abgesunken war (Abb. 8). Corticosteron konnte in 25 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 nicht befriedigend wiedergefunden werden (Abb. 9).

Versuche, 11-DOC und Corticosteron nach Veränderung der Lösungsmittelpolarität mit 25 ml Benzol/Äthylacetat 50/50 oder 40/60 als alleinigem Elutionsgemisch zu trennen, ergaben keine zufriedenstellenden Resultate. Die Peaks von 11-DOC erschienen zwar jetzt schon früher, nämlich

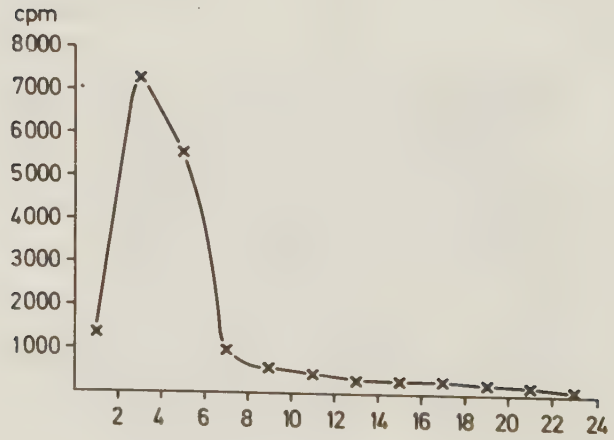

Abb. 8, 11-Desoxycorticosteron nach Elution mit Benzol/Äthylacetat 70/30 mit Peak bei 4 ml, eingesetzte Radioaktivität etwa 15000 cpm

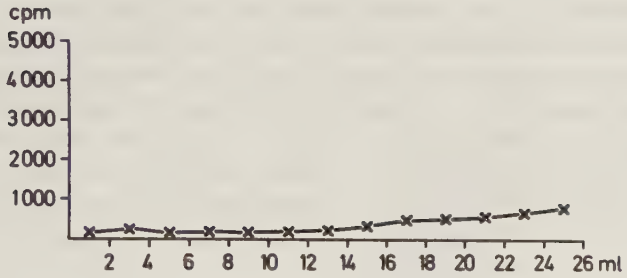

Abb. 9, Corticosteron nach Elution mit Benzol/Äthylacetat 70/30, ein Peak der eingesetzten Radioaktivität wird nicht gefunden,
eingesetzte Radioaktivität ca. 15000 cpm

bei 3 bzw. bei 2 ml, und auch Corticosteron wird jetzt sehr gut wiedergefunden, jedoch liegen die Corticosteron-peaks für das Gemisch 50/50 bei 6 ml, für 40/60 sogar schon bei 3 ml (Abb. 10).
Eine klare Trennung beider Substanzen ließ sich damit jedoch nicht erzielen.
Daher wurde im folgenden ein Wechsel der Elutionsgemische vorgenommen.

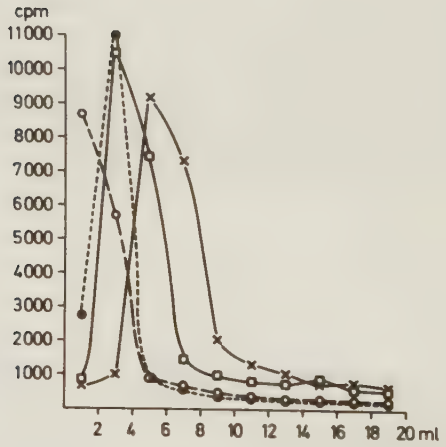

Abb. 10, Corticosteron- und 11-DOCpeaks nach Elution mit Benzol/Äthylacetat 50/50 bzw. 40/60

11-DOC: 50/50 ---•---•---, 40/60 ---o---
Corticosteron: 50/50—x——, 40/60 ——□——
11-DOC ca. 15000 cpm, Corticosteron ca. 18000 cpm

11-Desoxycorticosteron sollte einerseits möglichst frühzeitig so vollständig wie möglich eluiert werden, die Elution von Corticosteron andererseits solange hinausgezögert werden, daß sich bei guter Wiederfindung eine exakte Trennung vom 11-DOC erzielen ließ.

Daher wurde im folgenden anschließend an die Substanzvorgabe in CH_2Cl_2 zuerst mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und daran folgend mit 20 ml Benzol/Äthylacetat 40/60 chromatographiert und wiederum jeweils 2 ml Fraktionen aufgefangen. Abbildung 11 zeigt, daß das Elutionsmaximum für 11-DOC bei 5 ml mit einem steilen Abfall bis 8 ml liegt; in dem Elutionsgemisch 40/60 findet sich praktisch kein 11-DOC mehr.

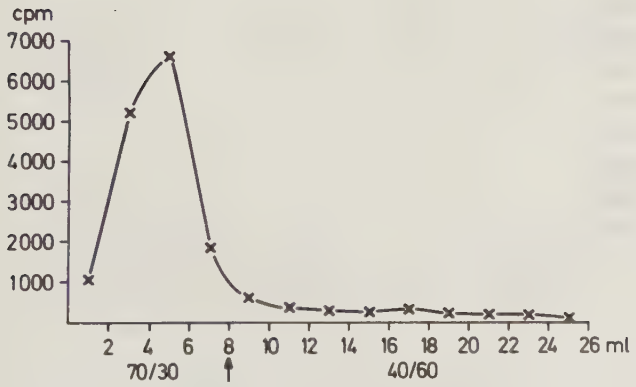

Abb. 11, 11-DOC Elution mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und daran anschließend 20 ml Benzol/Äthylacetat 40/60

Der Peak für Corticosteron erscheint nach dem Elutionsmittelwechsel in der 12 ml Fraktion, das heißt nach 4 ml Benzol/Äthylacetat 40/60, mit einem steilen Abfall bis zur 16 ml Fraktion, entsprechend nach 8 ml des Gemisches 40/60 (Abb. 12).

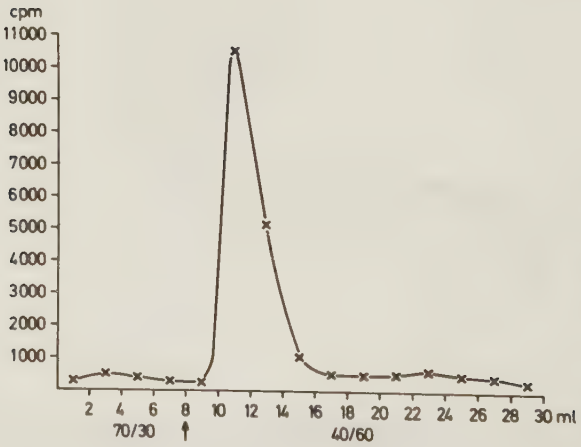

Abb. 12, Corticosteronelution mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und 20 ml Benzol/Äthylacetat 40/60

In den Vorversuchen war nur die Elution jeweils einer Substanz/Silicagelsäule mit verschiedenen Elutionsgemischen untersucht worden. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, daß auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von 11-DOC und Corticosteron auf einer Säule mit den gewählten Elutionsgemischen Benzol/Äthylacetat 70/30 (8 ml) und 40/60 (20 ml) eine gute chromatographische Trennung beider Steroide möglich ist. Der Peak von 11-DOC erreicht bei 5 ml sein Maximum mit steilem Abfall bis zur 8 ml Fraktion, Corticosteron wird mit der 11 ml Fraktion beginnend bis zur

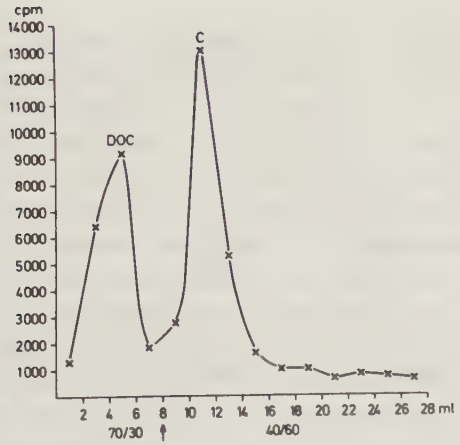

Abb. 13, 11-DOC und Corticosteron auf einer Säule mit Peaks nach 5 ml bzw. 11 ml

16 ml Fraktion eluiert.
Die Gesamtwiederfindung lag für Corticosteron bei 73,5%, für 11-Desoxycorticosteron bei 70,5%.
Um vor allem die Wiederfindung des für die nachfolgenden Gewebeuntersuchungen interessierenden Corticosteron zu verbessern, wurde das Elutionsgemisch Benzol/Äthylacetat 40/60 durch ein Gemisch Benzol/Äthylacetat 50/50 ersetzt. Der Peak des Corticosteron ist jetzt insgesamt verbreitert und erscheint später (Abb. 14).

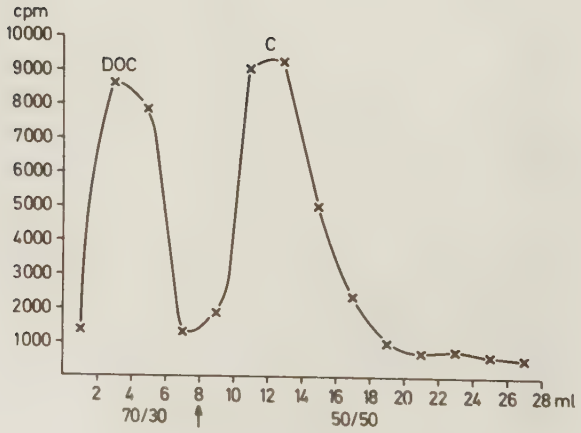

Abb. 14, 11-DOC und Corticosteron auf einer Säule nach Elution mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und 20 ml Benzol/Äthylacetat 50/50

Wie aus den Abbildungen 15 und 16 zu ersehen ist, gelingt es mit der oben dargestellten Methode nicht, auch Cortisol von Corticosteron chromatographisch zu trennen. Die Peaks beider Steroide liegen sehr dicht beieinander und überlagern sich zum Teil. Cortisol erreicht sein Elutionsmaximum bei Benutzung von Benzol/Äthylacetat 40/60 in der 15 ml Fraktion, bei 50/50 in der 17 ml Fraktion und liegt damit nur knapp 3 ml hinter dem Corticosteronpeak.

Für die vorliegende Arbeit war dies allerdings ohne größere Bedeutung, da die Nebennierenrinde der Ratte das Steroid Cortisol nur in vergleichsweise geringen Mengen synthetisiert.

Blankwertbestimmung

Um mögliche störende Einflüsse des bei der säulenchromatographischen Corticosteronabtrennung benutzten Kieselgels und der Elutionsgemische Benzol/Äthylacetat auf die radioimmunologische Corticosteronbestimmung auszuschließen, wurde untersucht, ob die verwendete Fraktion des Eluats (B/Ä 50/50) nach Durchlaufen der Säule ohne Steroidvorgabe, nach Eindampfen des Eluats im Vakuumexsikkator und Wiederlösen in 5% Äthanollösung im RIA antikörpergebundene Radioaktivität zu verdrängen in der Lage war.

Nach der radioimmunologischen Bestimmung des Eluats von 10 Säulen lag der so ermittelte Blankwert im Bereich des im RIA bestimmten Nullwertes der 5% Äthanollösung. Störende Einflüsse der entwickelten Silicagelsäule auf die radioimmunologische Corticosteronbestimmung konnten damit ausgeschlossen werden.

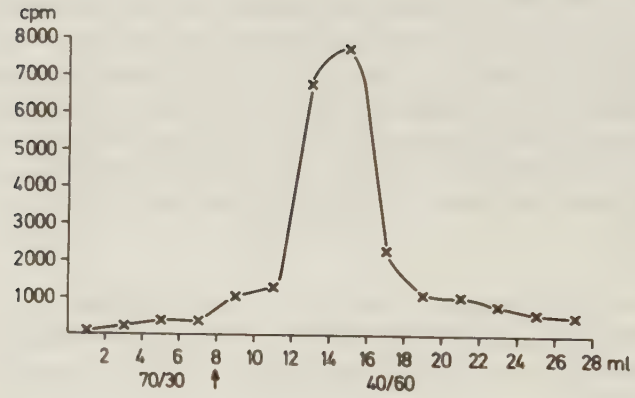

Abb. 15, Cortisolelution mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und 20 ml Benzol/Äthylacetat 40/60

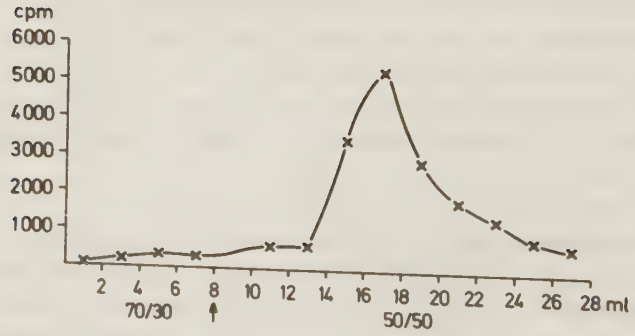

Abb. 16, Cortisolelution mit 8 ml Benzol/Äthylacetat 70/30 und 20 ml Benzol/Äthylacetat 50/50

Wiederfindungsmessung

Bei der Corticosteronbestimmung aus Serum und Nebennierengewebe wurden wegen der zum Teil schwierigen Extraktion grundsätzlich bei allen Proben Wiederfindungsbestimmungen durchgeführt.

Hierzu wurden den Proben vor den einzelnen Extraktionsschritten definierte Mengen tritiummarkierten Corticosterons (ca. 1500-3000 cpm) zugefügt; Nebennierengewebe wurde entsprechend vor der Homogenisierung radioaktiv markiert. Nach der oben beschriebenen Wiederlösung der eingedampften Extrakte in der im Radioimmunoassay eingesetzten 5%igen Äthanol-Lösung wurde die Radioaktivität eines Aliquots bestimmt, wobei die vorher eingesetzte Radioaktivität gleich 100% gesetzt wurde. Die im RIA bestimmten Corticosteronkonzentrationen wurden dann entsprechend der prozentualen Wiederfindung auf 100% umgerechnet.

Die Wiederfindung für die Serum-Corticosteron-Extraktion mit der Methode nach VESCEI lag bei 68,8%.

Corticosteronreinsubstanz wurde nach Durchlaufen der Silicagelsäule zu im Mittel 83,4% wiedergefunden. Die Wiederfindung von aus Nebennierengewebe extrahiertem Corticosteron lag im Mittel bei 65,6%.

4. Mathematisch - statistische Auswertung

Die mathematisch-statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Anwendung der STUDENT - t - Verteilung.

Neben der F - Verteilung und der X^2 - Verteilung gehört die t - Verteilung zu den wichtigsten statistischen Tests. Hauptanwendungsgebiet der t - Verteilung ist die Statistik kleiner und mittlerer Stichprobenumfänge ($n < 100$).
Die t - Verteilung ist dabei der Normalverteilung sehr ähnlich. Ebenso wie diese ist sie stetig, glockenförmig und symmetrisch; ihr Variationsbereich reicht von $-\infty$ bis $+\infty$. Bestimmt wird die Form der t - Verteilung von den Freiheitsgraden ($n=N-1$). Sind die Freiheitsgrade klein, so divergiert die t - Verteilungskurve von der Normalverteilung, indem ihre Kurven flacher verlaufen und sich damit die Wahrscheinlichkeit vom zentralen in den peripheren Kurventeil verschiebt.
Werden die Freiheitsgrade größer, so geht die t - Verteilung schließlich in die Normalverteilung über.

Mit dem STUDENT oder t - Test werden Signifikanzen berechnet, die statistisch den Unterschied zweier Kollektive sichern können. Dabei dienen die Mittelwerte $\bar{x}$ und die Standardabweichungen s als Ausgangspunkte der statistischen Berechnungen.

Der Mittelwert $\bar{x}$ ist definiert als die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl eben dieser Beobachtungen

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \cdot (x_1 + x_2 + \ldots + x_n)$$

Die Standardabweichung bestimmt die Ausweitung, Schwankung, Streuung oder Dispersion der Einzelwerte vom Mittelwert einer Meßreihe. Sie berechnet sich aus der Wurzel des Mittelwertes der quadrierten Abweichungen.

$$(2) \quad s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die Zahl t, die bei der STUDENT - Verteilung zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit p dient, wird aus der Differenz der Mittelwerte zweier Stichproben und der Standardabweichung s_D dieser Differenz errechnet.

$$(3) \quad t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s_D}$$

Dabei ist die Standardabweichung der Differenz der Mittelwerte gleich der Quadratwurzel aus der Summe der Quadrate der Streuungen $s_{\bar{x}}$ und $s_{\bar{x}'}$, der Mittelwerte $\bar{x}$ und $\bar{x}'$.

$$(4) \quad s_D = \sqrt{s^2_{\bar{x}} + s^2_{\bar{x}'}}$$

Die Wahrscheinlichkeit p drückt die Signifikanz aus, mit der die Einzelwerte eines Kollektivs innerhalb der Verteilungskurve eines zu vergleichenden Kollektivs liegen.

Als signifikant bezeichnet wurden Unterschiede, bei denen im Vergleich zweier Kollektive $p < 0{,}05$ war, das heißt bei denen mit mehr als 95%iger statistischer Sicherheit Einzelwerte des einen Kollektivs außerhalb der Verteilungskurve des anderen lagen.

Zur tabellarischen Auffindung der Wahrscheinlichkeit p wurde die Tabelle für die STUDENT - Verteilung aus L.SACHS, Statistische Methoden, 2. Auflage 1972 benutzt.

In der vorliegenden Arbeit war auch die Berechnung der Vertrauensgrenzen oder des Konfidenzintervalls für den Mittelwert μ erforderlich, da nach der Methode der größten Mutmaßlichkeit eine Schätzung des Gesamtparameters mit Hilfe der Ergebnisse einer Stichprobe vorgenommen wurde.

Dabei ist es erforderlich, die Grenzen festzulegen, innerhalb derer sich der Mittelwert des Kollektivs mit einer statistischen Sicherheit von 95% bewegt.

Der 95% - Vertrauensbereich für den unbekannten Mittelwert μ einer zumindest angenähert normalverteilten Grundgesamtheit ist gegeben durch

$$(5) \quad \bar{x} - 1{,}96\frac{s}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + 1{,}96\frac{s}{\sqrt{n}}$$

wobei s die Standardabweichung der Grundgesamtheit ist und n der Stichprobenumfang. Der Wert 1,96 errechnet sich aus dem t - Tabellenwert und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (t · 0,05).

Zur Darstellung einer möglichen Abhängigkeit der gemessenen Parameter untereinander wurden die Probenwerte als Punktepaare (x_i, y_i) in ein Koordinatensystem eingetragen, um eine Grundvorstellung über Streuung und Form der Punktewolke zu erhalten.
Mit dem Korrelationskoeffizienten r wurde der Grad des Zusammenhangs zwischen den Stichprobenwerten der Zufallsvariablen x_i und y_i bestimmt. r ist als Schätzwert ϱ ein Maß für die Regelmäßigkeit oder Unregelmäßigkeit, mit der miteinander korrelierte Werte gemeinsam gleich häufig steigen oder fallen ($-1 \leq \varrho \leq 1$).

$$(6) \quad r = \frac{\sum (x - \bar{x})\,(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$ bei kleinem n gilt:

$$(7) \quad r^* = r\left[1 + \frac{1 - r^2}{2(n - 3)}\right]$$

III. Ergebnisse

1. TSH - Versuch

Der Gewichtsverlauf der wachsenden Tiere zeigte innerhalb der einzelnen Kollektive keine signifikanten Unterschiede (Abb. 17), obwohl bei den beiden mit TSH behandelten Gruppen die Gewichtskurve - vermutlich aufgrund des erhöhten Grundumsatzes - deutlich flacher verläuft als bei den allein mit Lithium behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (Abb. 18).

Die mit TSH stimulierten Schilddrüsen waren gegenüber denen des Kontrollkollektivs mit $p < 0,01$ signifikant vergrößert, wobei die Schilddrüsen der mit TSH und Lithium behandelten Tiere den größten Gewichtszuwachs zu verzeichnen hatten. Aber auch Lithium alleine entwickelte eine strumigene Wirkung und verursachte eine mit $p < 0,05$ signifikante Gewichtszunahme der Organe gegenüber den Kontrolltieren. Die Schilddrüsengewichte in Abb. 19 sind in mg/100 g Körpergewicht angegeben.

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen des Schilddrüsenparenchyms zeigten sich deutliche Veränderungen.

Die mit 5 USP/die TSH-stimulierten Organe zeigten englumige Follikel, die zum Teil kein Kolloid enthielten. Die Follikelepithelien waren von der Form her zylindrisch, häufig zeigten sich kleine Vakuolen im Cytoplasma. Die Kerne waren rund oder längsoval, die Nukleolen meist klein. Bei geringer Kernpolymorphie fanden sich vereinzelt Mitosen.

Bei den Tieren, die neben TSH zusätzlich Lithiumchlorid (2,5 mval/die)erhalten hatten, enthielten die mittelweiten Follikel schwach eosin gefärbtes Kolloid.

In der Follikelperipherie fanden sich Resorptionsvakuolen. Das Cytoplasma der kubischen bis abgeflachten Follikelepithelien war zum Teil aufgehellt; die Zellkerne waren insgesamt kleiner als in der ersten Gruppe.

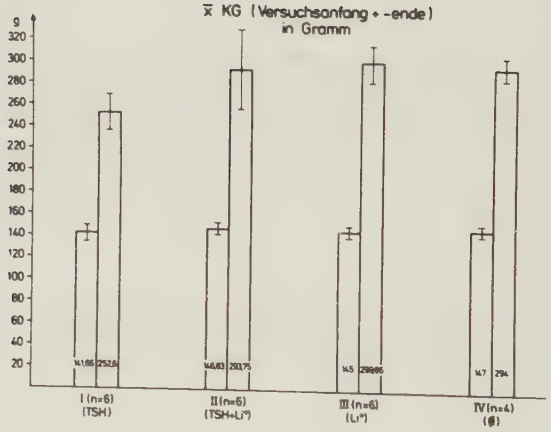

Abb. 17, Körpergewichte am Anfang und Ende des Versuchs

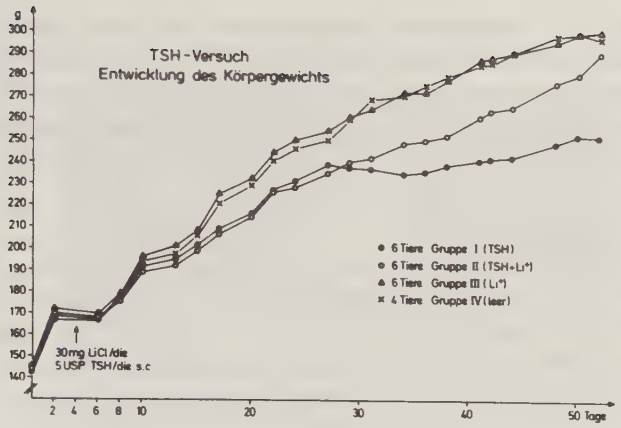

Abb. 18, Entwicklung der Körpergewichte, I = TSH, II = TSH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

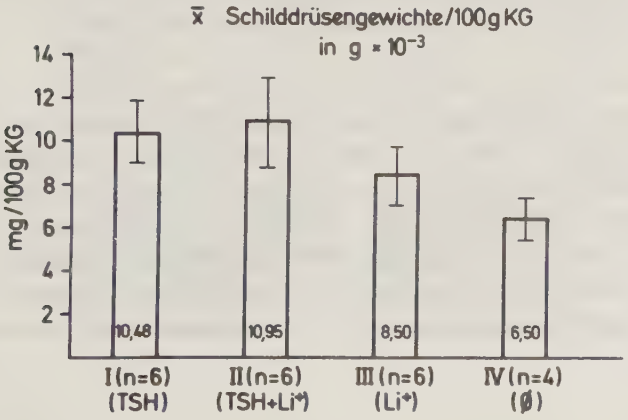

Abb. 19, Schilddrüsengewicht in mg/100 g KG
I = TSH, II = TSH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

Nach alleiniger chronischer Lithiumgabe (2,5 mVal/die) fanden sich kolloidhaltige dilatierte Follikel ohne Resorptionsvakuolen. Die Follikelepithelien waren plattenförmig abgeflacht mit teilweise breitem, hellen Cytoplasmaleib. Insgesamt bot sich das Bild der sogenannten ruhenden Schilddrüse.

In der unbehandelten Kontrollgruppe waren die mittelweiten Schilddrüsenfollikel kolloidhaltig mit einigen Resorptionsvakuolen, ähnlich wie in der Gruppe, die neben TSH Lithium erhalten hatten. Die kubischen hellzelligen Follikelepithelien hatten rundliche mittelgroße Kerne.

Insgesamt zeigten sich bei den beiden mit Lithium behandelten Gruppen deutliche Zeichen eines gestörten Sekretionsprozesses. In Abbildung 20 ist links oben die Gruppe, die TSH, rechts oben die Gruppe, die TSH und Lithium, und links unten die Gruppe, die alleine Lithium erhielt, dargestellt; rechts unten ist ein Schilddrüsenschnitt der unbehandelten Kontrollgruppe zu sehen.

Eine signifikante Erniedrigung der Serum-cAMP-Spiegel fand sich bei beiden mit Lithiumchlorid behandelten Kollektiven ($p < 0,05$). Bei den nur mit TSH behandelten Tieren lagen die Serum-cAMP-Spiegel um 61,5% über denen der unbehandelten Kontrollen. Bei gleichzeitiger Lithiumapplikation vermochte TSH eine Stimulierung der Bildung von cAMP nicht zu induzieren, die cAMP-Spiegel beider mit Lithium behandelten Kollektive sind annähernd gleich (Abb. 21).

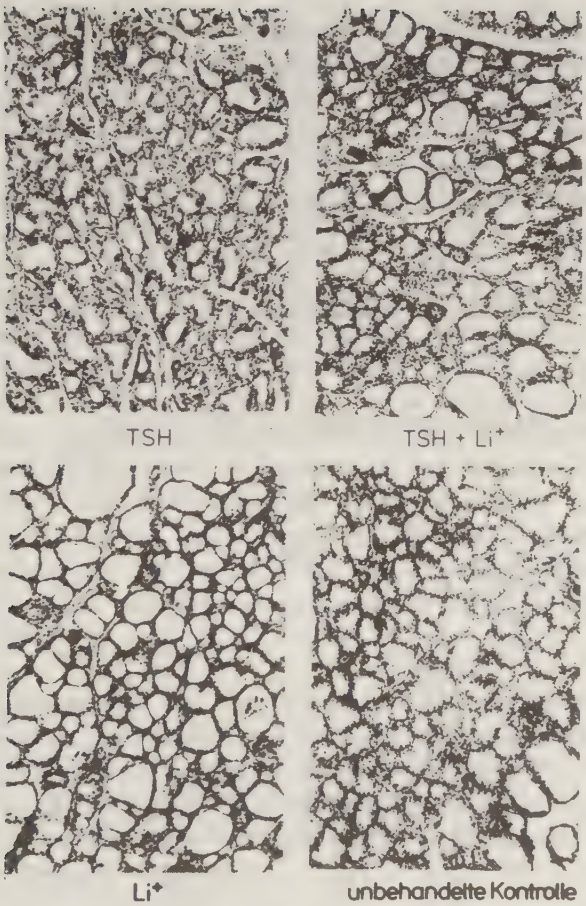

Abb. 20, Schilddrüsenhistologie, H.E.-Färbung, li. ob.:I=TSH, re. ob.:II=TSH + Li^+, li. u.:III=Li^+, re. u.:IV=Ø

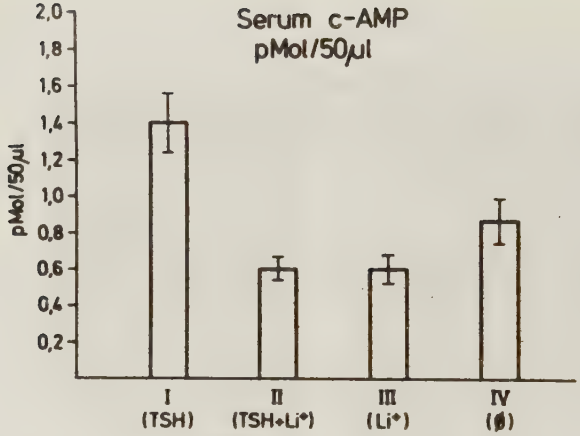

Abb. 21, Serum-cAMP-Spiegel in pMol/50 µl

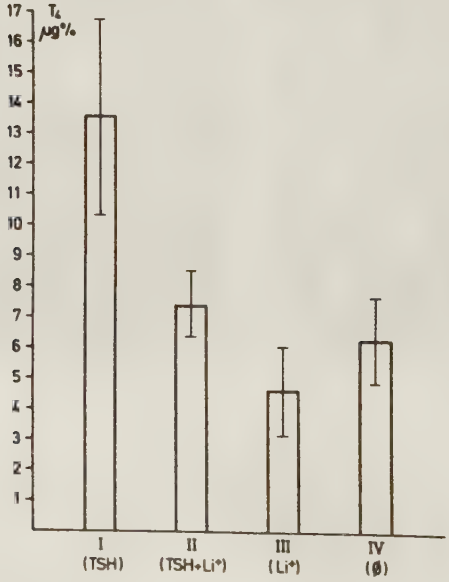

Abb. 22, Gesamtthyroxin im Serum

Ähnlich wie die cyclo AMP Spiegel lagen auch die Serumkonzentrationen des Gesamtthyroxin der beiden Lithium-Gruppen signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) unter denen der nur mit TSH stimulierten Gruppe. Allerdings findet sich hier in der mit TSH und Lithium behandelten Gruppe eine mit $p < 0,01$ signifikante T_4-Erhöhung gegenüber der Lithiumgruppe. Dieser Wert liegt sogar leicht über dem der unbehandelten Kontrolle, die im Vergleich mit der TSH-Gruppe einen um etwa 46% erniedrigten Wert ($p < 0,01$) aufweist (Abb. 22).

Der Normalisierte Thyroxin Quotient (NTR, Normal Thyroxin Ratio) verhält sich analog den Thyroxin-Serum-Konzentrationen. Im Gegensatz zu den T_4-Werten ist allerdings der NTR der mit TSH und Lithium behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen signifikant mit $p < 0,05$ erhöht. Ähnliche wie das Serum-T_4 sind auch die NTR-Werte der allein mit Lithium behandelten Ratten gegenüber den Kontrolltieren leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Erwartungsgemäß ist der NTR des nur mit TSH behandelten Kollektivs bei allen Vergleichen signifikant erhöht (Abb. 23).

Eine Zusammenstellung der gefundenen Werte sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Angaben schließen die Standardabweichung mit ein. Aus den Tabellen 4a + b sind die mit dem STUDENT t-Test errechneten Signifikanzen zu ersehen; es wurde dabei jede Gruppe mit allen übrigen Gruppen verglichen.

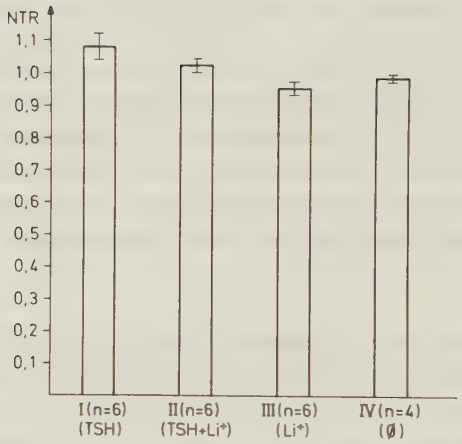

Abb. 23, NTR (Normalisierter Thyroxin Quotient, Normal Thyroxin Ratio)

	I TSH	II TSH + Li^+	III Li^+	IV Ø
Körpergewicht g	252,6±16,19	293,75±35,84	299,66±17,39	294,0±9,89
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,48±1,81	10,95±2,50	8,5 ± 1,64	6,5±0,70
Serum cAMP pMol/50 µl	1,40±0,16	0,59±0,06	0,596±0,07	0,86±0,12
Gesamtthyroxin µg/100 ml	13,52±3,2	7,34±0,96	4,58±1,46	6,24±1,4
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,08±0,045	1,02±0,025	0,95±0,023	0,98±0,014

Tab. 3, TSH-Versuch, Darstellung der bei 4 Kollektiven gefundenen Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung.

	I	II	p
Körpergewicht g	232,6±16,19	293,75±35,84	NS
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,48±1,81	10,95±2,50	NS
Serum cAMP pMol/50 µl	1,40±0,16	0,39±0,06	< 0,001
Gesamtthyroxin µg/100 ml	13,52±3,2	7,34±0,96	< 0,01
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,08±0,045	1,02±0,025	< 0,05

	I	III	p
Körpergewicht g	232,6±16,19	299,66±17,39	< 0,01
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,48±1,81	8,5 ± 1,64	NS
Serum cAMP pMol/50 µl	1,40±0,16	0,596±0,07	< 0,001
Gesamtthyroxin µg/100 ml	13,52±3,2	4,58±1,46	< 0,001
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,08±0,045	0,93 ± 0,023	< 0,001

	I	IV	p
Körpergewicht g	232,6±16,19	294 ± 9,89	< 0,01
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,48±1,81	6,5±0,70	< 0,01
Serum cAMP pMol/50 µl	1,40±0,16	0,86±0,12	< 0,01
Gesamtthyroxin µg/100 ml	13,52±3,2	6,24±1,4	< 0,01
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,08±0,045	0,98±0,014	< 0,01

	II	III	p
Körpergewicht g	293,75±35,84	299,66±17,39	NS
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,95±2,50	8,5 ± 1,64	NS
Serum cAMP pMol/50 µl	0,39±0,06	0,596±0,07	NS
Gesamtthyroxin µg/100 ml	7,34±0,96	4,58 ± 1,46	< 0,01
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,02±0,025	0,93 ± 0,023	< 0,01

	II	IV	p
Körpergewicht g	293,75±35,84	294,0±9,89	NS
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	10,95±2,50	6,5±0,70	< 0,01
Serum cAMP pMol/50 µl	0,39 ± 0,06	0,86±0,12	< 0,05
Gesamtthyroxin µg/100 ml	7,34 ± 0,96	6,24±1,40	NS
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	1,02 ± 0,025	0,98±0,014	< 0,05

	III	IV	p
Körpergewicht g	299,66±17,39	294,0±9,89	NS
Schilddrüsengew. mg/100 g KG	8,5 ± 1,64	6,5±0,70	< 0,05
Serum cAMP pMol/50 µl	0,596 ± 0,07	0,86±0,12	< 0,05
Gesamtthyroxin µg/100 ml	4,58 ± 1,46	6,24±1,40	NS
NTR(Normal Thyroxin Ratio)	0,93 ± 0,023	0,98±0,014	NS

Tab. 4a u. b

2. Thyroxin - Versuch

Artefizielle Thyroxinintoxikation bewirkte nach 9 Tagen eine signifikante Gewichtsreduktion gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Bei zusätzlicher Lithiumzufuhr war diese Gewichtsreduktion signifikant sowohl gegenüber den Kontrollen wie auch gegenüber den allein mit T_4 behandelten Tieren.
Nach alleiniger Lithiumapplikation ließ sich gegenüber dem unbehandelten Vergleichskollektiv eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes nicht feststellen.
Abb. 24 stellt das mittlere Körpergewicht der einzelnen Kollektive am 9. Versuchstag dar.

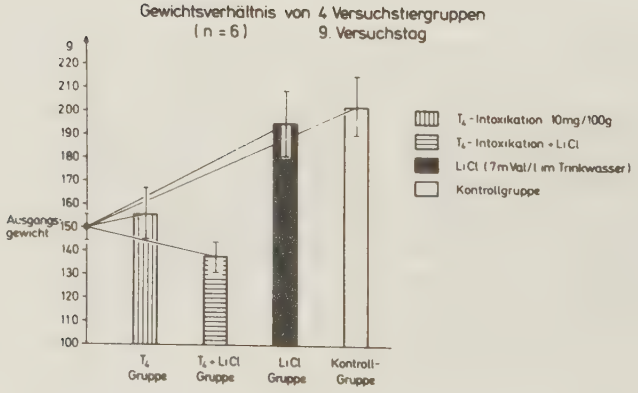

Abb. 24, Körpergewichte zu Beginn und am Ende des Versuchs bei artefizieller Thyroxinintoxikation

Nach 10tägiger Zufuhr von 10 mg Thyroxin/100 g KG lagen die Gesamt-T_4-Spiegel mit im Mittel 32 µg/100 ml signifikant über denen der unbehandelten Kontrollen.
Bei gleichzeitiger Lithiumgabe erhöhten sich die peripheren Hormonspiegel auf im Mittel 35 µg/100 ml, waren aber gegenüber der ersten Gruppe nicht signifikant.
Lithium alleine reduzierte die Thyroxinspiegel gegenüber dem Vergleichskollektiv um etwa 30% (Abb. 25)

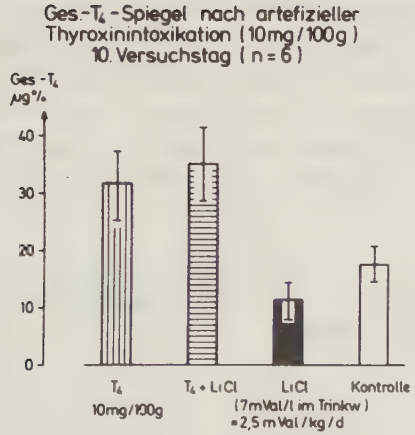

Abb. 25, Gesamtthyroxinspiegel nach 10tägiger artefizieller Thyroxinintoxikation

Die Überlebensrate thyroxinintoxikierter Ratten sank im Langzeitversuch nach 38 Tagen auf etwa 35% ab. Es zeigte sich jedoch, daß bei gleichzeitiger Gabe von Lithiumchlorid im Trinkwasser zu jedem Zeitpunkt des Versuches die Überlebensrate der Tiere geringer war als bei alleiniger Thyroxinzufuhr Schon nach 9 Tagen sank die Überlebensrate auf 90% ab und lag schon nach 32 Tagen bei 0% (Abb. 26).

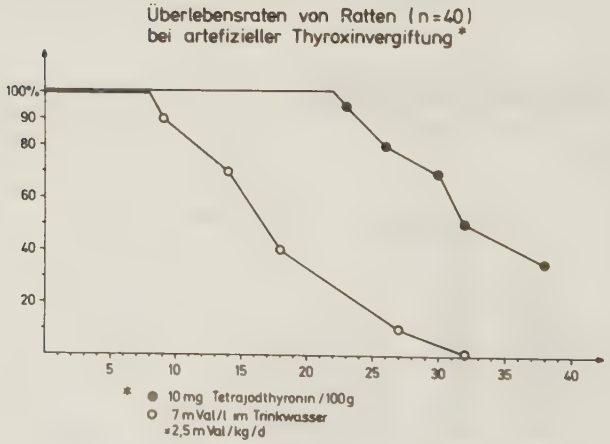

Abb. 26, Überlebensraten von Ratten bei artefizieller T_4-Intoxikation

3. ACTH-Versuch

Der Gewichtsverlauf der wachsenden Tiere zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den lithiumbehandelten Tieren. Vermutlich aufgrund der induzierten katabolen Stoffwechselsituation hatten die ACTH-behandelten Tiere einen Gewichtseinstand. Bei den zusätzlich mit Lithium behandelten Tieren lag das Körpergewicht nach 17 Tagen um etwa 10% unterhalb des Ausgangsgewichtes (Abb. 27a u. b).

Abb. 28 zeigt jeweils aus einer Gruppe die typisch veränderten Nebennierenrindenorgane. Die Nebennieren der ACTH-stimulierten Tiere waren erwartungsgemäß deutlich vergrößert. Die größten Nebennieren hatten allerdings die im Körpergewicht leichtesten Tiere, die mit ACTH und Lithiumchlorid behandelt worden waren. Die Nebennieren dieses Kollektivs zeigten eine blau-violette Farbe, die schon makroskopisch auf eine intra-adrenale Blutung schließen ließ.

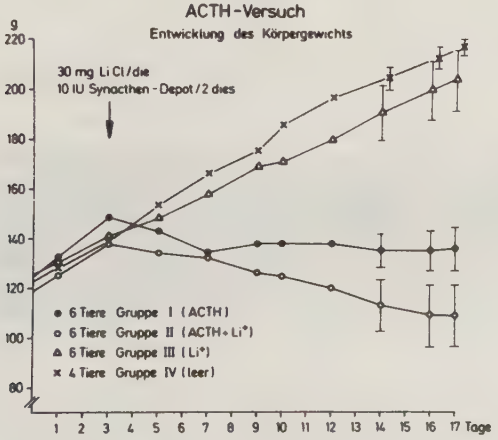

Abb. 27a, Entwicklung des Körpergewichts, I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

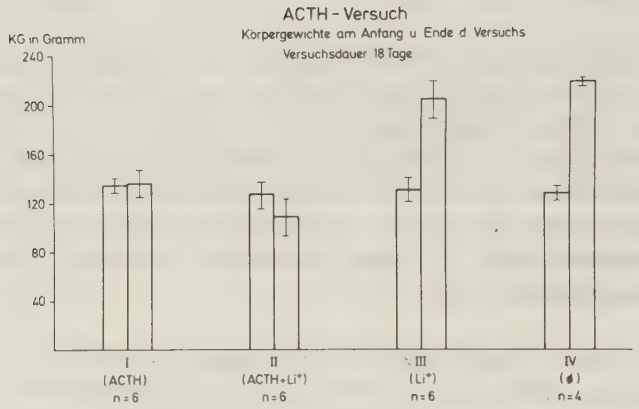

Abb. 27b, Körpergewichte am Anfang und Ende des Versuchs, I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

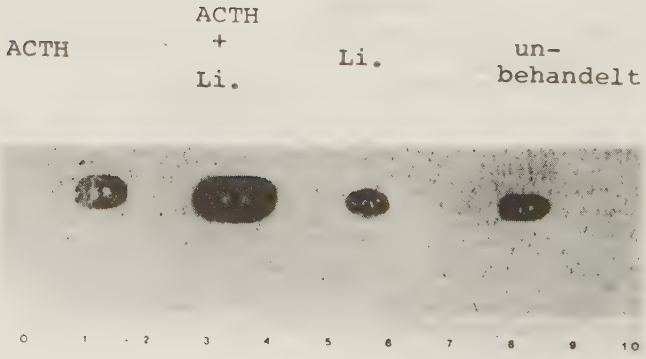

Abb. 28, Nebennieren aus je einer Gruppe des Versuchs I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

Die signifikanten Gewichtsunterschiede der Nebennieren aller Kollektive bezogen auf 100 g Körpergewicht sind aus Abb. 29 ersichtlich. Obgleich die Organe der mit ACTH und Lithium behandelten Tiere um zum Teil 50% schwerer waren als die der mit ACTH allein behandelten Tiere, war dieser deutliche Unterschied aufgrund der breiten Streuung um den Mittelwert nicht signifikant. Die kleinsten Nebennieren hatten die unbehandelten Kontrollen; ihre Gewichte lagen mit $p < 0,05$ signifikant sogar noch unter denen der nur mit Lithium behandelten Tiere.

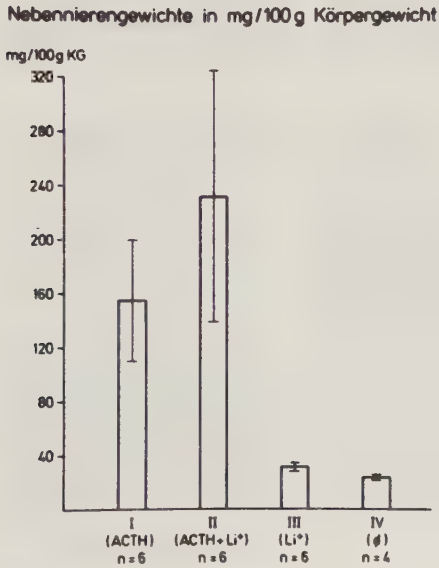

Abb. 29, Nebennierengewichte in mg/100 g KG
I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

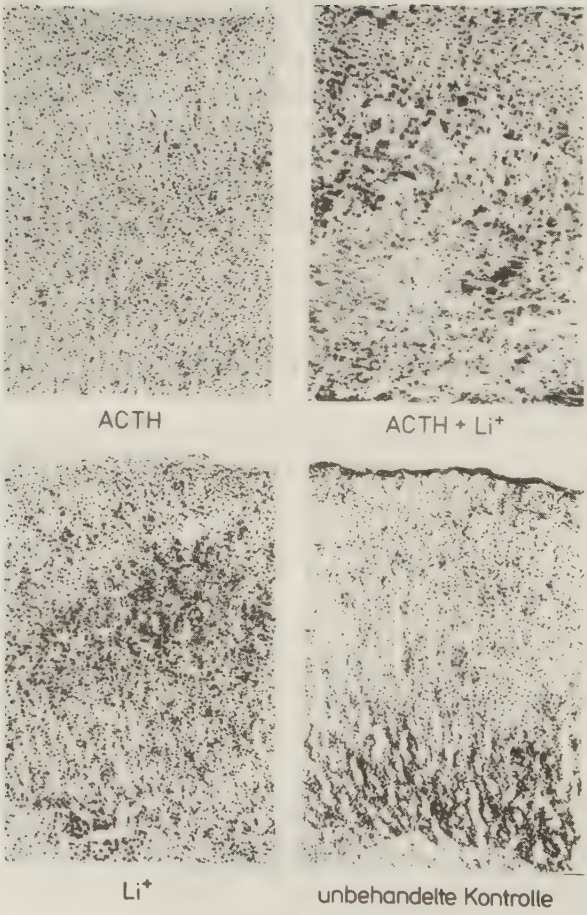

Abb. 30, histologische Aufarbeitung der Nebennierenrinde, H.E.-Färbung, li. ob.: I=ACTH, re. ob.: II=ACTH+Li^+, li. u.: III=Li^+, re. u.: IV=Ø

Bei der histologischen Untersuchung der Nebennieren der vier unterschiedlich behandelten Versuchstiergruppen zeigten sich deutliche Strukturveränderungen (Abb. 30).

Bei den nur mit ACTH-stimulierten Nebennieren war die übliche Dreizonengliederung verwischt. Die Zellen waren überwiegend nach Art der Zona fasciculata angeordnet. Die Cytoplasmaleiber waren breit und hell und wirkten in der H.E.-Färbung optisch fast leer. Die Zellen enthielten reichlich Lipoidtropfen. Es imponierte das Bild der sogenannten "progressiven Transformation".

In den Organen, die neben der Stimulation mit ACTH noch zusätzlich mit Lithiumchlorid behandelt worden waren, waren nur die subkapsulären Rindenpartien regelrecht gestaltet. Eine Abgrenzung zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata war nicht mehr möglich. In der Fettfärbung zeigte sich ein nur mäßiger Lipoidgehalt der Zellen. Die inneren 3/4 der Nebennierenrinde waren von ausgedehnten Blutungen durchsetzt. Größtenteils waren die Rindenzellen nekrotisch verändert, die Textur des Gewebes zerstört. Die nekrobiotisch veränderten Rindenzellen schlossen Cytoplasmavakuolen ein, die in der Fettfärbung positiv angefärbtes Material enthielten. Insgesamt entsprach das Bild einer hämorrhagischen Infarzierung der Nebennierenrinde mit Aussparung kleiner subkapsulärer Anteile.

Bei den Tieren mit alleiniger Lithiumbehandlung waren in der Nebennierenrinde Zona glomerulosa und Zona fasciculata deutlich getrennt. In den Zellen der Zona glomerulosa und der äußeren Zona fasciculata fanden sich in der Fettfärbung grobschollige Lipoidablagerungen. Nach innen zu zeigte sich in der Fettfärbung eine Abnahme des Lipoidgehaltes und eine Zunahme der optischen Dichte in der H.E.-Färbung. Im Cytoplasma waren reichlich Vakuolen. Die Zellen der Zona reticularis waren klein und von weiten Sinus umgeben.

Eine normale Nebennierenrindenstruktur stellte sich in der unbehandelten Kontrollgruppe dar, bei der die einzelnen Zonen deutlich getrennt waren. In der Fettfärbung verteilte sich der Lipoidgehalt in etwa gleichmäßig.

Die Konzentration an Serum-cycloAMP war in der mit ACTH und Lithium behandelten Gruppe gegenüber allen anderen Kollektiven signifikant erhöht. Die niedrigsten Werte fanden sich bei den nur mit Lithiumchlorid behandelten Tieren. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den übrigen Gruppen in keinem Fall signifikant (Abb. 31).

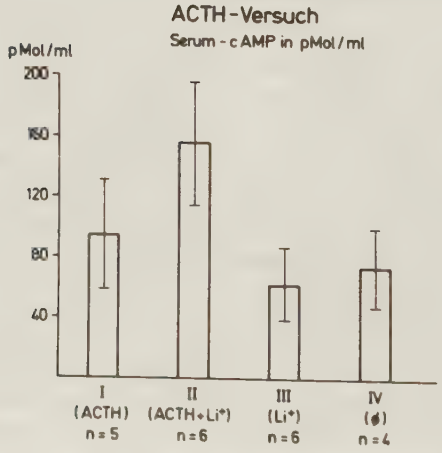

Abb. 31, Serum-cAMP-Spiegel in pMol/ml,
I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = ø

Bei der Darstellung der Serumcorticosteronspiegel zeigte sich eine signifikante Erhöhung bei beiden mit ACTH behandelten Kollektiven gegenüber der Kontrollgruppe und der allein mit Lithium behandelten Gruppe ($p < 0,02$ bis $p < 0,001$), wobei die höchsten Werte von den mit ACTH und Lithium behandelten Tieren erreicht wurden. Die niedrigsten Werte fanden sich bei den nur mit Lithium behandelten Tieren; sie waren allerdings nicht signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 32).

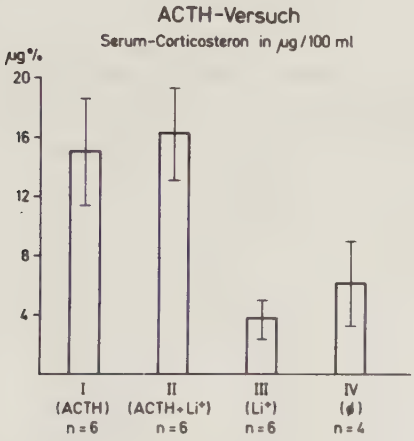

Abb. 32, Serum-Corticosteron-Spiegel in µg/100 ml
I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = Ø

Die Unterschiede im Corticosterongehalt des Nebennierengewebes waren zwischen allen 4 Gruppen zum Teil hochsignifikant. Durch Ausschaltung beeinflussender Größen wie dem Verteilungsraum traten die bei Bestimmung der Serumcorticosteronspiegel gefundenen Unterschiede deutlicher hervor. Auch hier fanden sich bei den mit ACTH und Lithium behandelten Tieren die höchsten Werte, die nun sogar gegenüber den allein mit ACTH behandelten Ratten mit $p < 0{,}002$ signifikant waren. Unter basalen Bedingungen führte Lithiumapplikation allerdings zu einer etwa 50%igen Reduzierung des Corticosterongehaltes der Nebenniere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($p < 0{,}05$). In Abb.33 ist der Corticosterongehalt der Nebennieren angegeben in µg/g Gewebe.

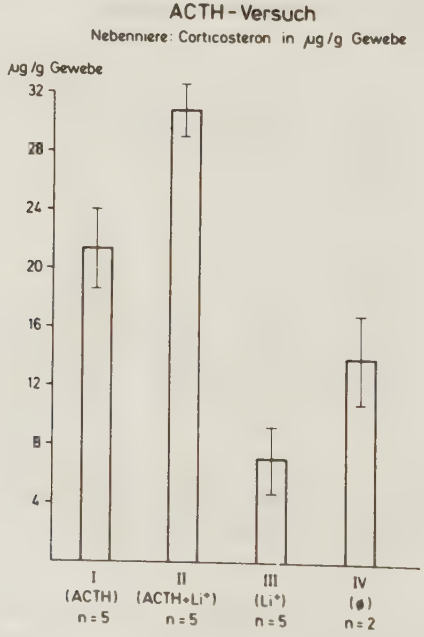

Abb. 33, Corticosterongehalt der Nebennieren in µg/g Gewebe
I = ACTH, II = ACTH + Li^+, III = Li^+, IV = ø

Die enge Korrelation zwischen Serumcorticosteron und dem Corticosterongehalt der Nebennieren wird aus Abb. 34 ersichtlich. Der Korrelationskoeffizient r erreicht einen Wert von 0,939. Auch zwischen Serum-cAMP-Spiegeln und Serumcorticosteron einerseits und Serum-cAMP-Spiegeln und dem Corticosterongehalt der Nebenniere besteht eine enge Korrelation wie aus Abb. 35a u. b zu ersehen ist. Bei beiden Korrelationsellipsen erreicht der Korrelationskoeffizient nicht ganz so hohe Werte wie in Abb. 34, jedoch ist die Korrelation zwischen Serum-cAMP und Serumcorticosteron mit r = 0,85 und zwischen Serum-cAMP und Nebennierencorticosteron mit r = 0,879 signifikant.

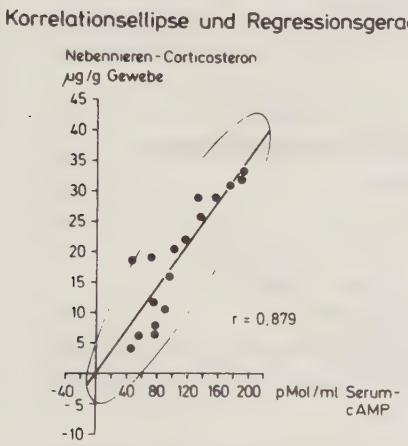

Abb. 35a, Korrelationsellipse und Regressionsgerade für Serum-cAMP und Corticosterongehalt der Nebennieren

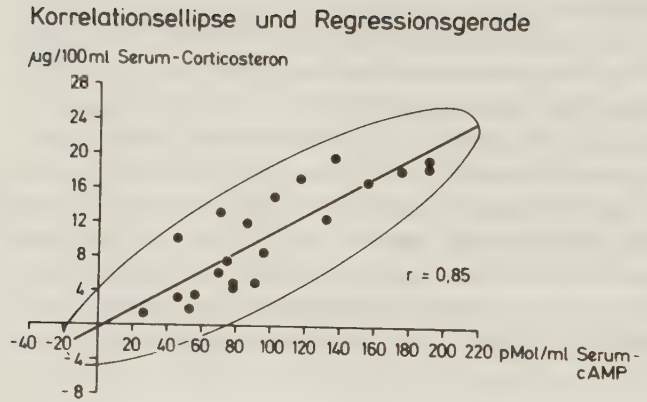

Abb. 35b, Korrelationsellipse und Regressionsgerade für Serum-cAMP und Serum-Corticosteron

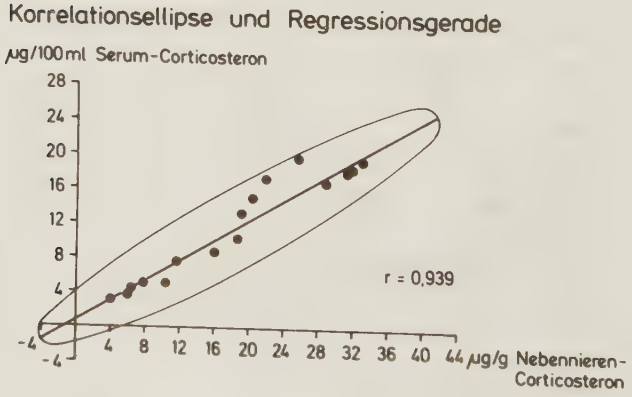

Abb. 34, Korrelationsellipse und Regressionsgerade für Serum-Corticosteron und Corticosterongehalt der Nebennieren

Die Tabelle 5 faßt noch einmal alle Ergebnisse mit Mittelwert und Standardabweichung zusammen. Aus den Tabellen 6a u. b sind die Vergleiche der Werte der 4 Kollektive untereinander einschließlich der nach dem STUDENT t-Test ermittelten Signifikanzen (p-Wert) dargestellt.

ACTH-Versuch

	I ACTH	II ACTH + Li^+	III Li^+	IV ø
Körpergewicht g	136 ± 10,77	108,6 ± 15,42	203,66 ± 19,98	216,5 ± 3
mg Nebennieren-gew. 100 g KG	155,1 ± 45,71	232,1 ± 93	31,66 ± 3,16	23,78 ± 1,78
Serum cAMP pMol/ml	94,58 ± 36,25	155,13 ± 40,67	62,73 ± 24	73,7 ± 17,49
Serum-Cortico-steron µg/100 ml	12,95 ± 6,15	16,24 ± 3,14	3,79 ± 1,38	6,14 ± 2,89
µg Corticosteron g Nebennierengewebe	21,21 ± 2,89	30,8 ± 1,86	6,89 ± 2,34	13,85 ± 3,04

Tab. 5, Darstellung der bei 4 Kollektiven gefundenen Werte als Mittelwerte mit Standardabweichung

	I	II	p
Körpergewicht g	136 ± 10,77	108 ± 15,42	< 0,02
mg Nebennieren-gewicht/100 g KG	155,1 ± 45,71	232,1 ± 93	NS
Serum cAMP pMol/ml	94,56 ± 36,25	155,13 ± 40,67	< 0,05
Serum-Corticosteron µg/100 ml	15,09 ± 3,59	16,24 ± 3,14	NS
µg Corticosteron/ g Nebennierengewebe	21,21 ± 2,89	30,8 ± 1,86	< 0,002

I	III	p
136 ± 10,77	203,66 ± 19,98	< 0,001
155,1 ± 45,71	31,66 ± 3,16	< 0,001
94,56 ± 36,25	62,73 ± 24	NS
15,09 ± 3,59	3,79 ± 1,36	< 0,001
21,21 ± 2,89	6,98 ± 2,34	< 0,001

	I	IV	p
Körpergewicht g	136 ± 10,77	216,5 ± 3	< 0,0001
mg Nebennieren-gewicht/100 g KG	155,1 ± 45,71	23,78 ± 1,78	< 0,001
Serum cAMP pMol/ml	94,56 ± 36,25	73,7 ± 17,49	NS
Serum-Corticosteron µg/100 ml	15,09 ± 3,59	6,14 ± 2,89	< 0,02
µg Corticosteron/ g Nebennierengewebe	21,21 ± 2,89	13,85 ± 3,04	< 0,05

II	III	p
108,6 ± 15,42	203,66 ± 19,98	< 0,0001
232,1 ± 93	31,66 ± 3,16	< 0,002
155,13 ± 40,67	62,73 ± 24	< 0,01
16,24 ± 3,14	3,79 ± 1,36	< 0,001
30,8 ± 1,86	6,98 ± 2,34	< 0,0001

	II	IV	p
Körpergewicht g	108,6 ± 15,42	216,5 ± 3	< 0,0001
mg Nebennieren-gewicht/100 g KG	232,1 ± 93	23,78 ± 1,78	< 0,002
Serum cAMP pMol/ml	155,13 ± 40,67	73,7 ± 17,49	< 0,01
Serum-Corticosteron µg/100 ml	16,24 ± 3,14	6,14 ± 2,89	< 0,01
µg Corticosteron/ g Nebennierengewebe	30,8 ± 1,86	13,85 ± 3,04	< 0,001

III	IV	p
203,66 ± 19,98	216,5 ± 3	NS
31,66 ± 3,16	23,78 ± 1,78	< 0,05
62,73 ± 24	73,7 ± 17,49	NS
3,79 ± 1,36	6,14 ± 2,89	NS
6,98 ± 2,34	13,85 ± 3,04	< 0,05

Tab. 6a u. b

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. TSH-/T_4-Versuch

1. TSH bewirkte eine Verlangsamung des Gewichtsanstieges wachsender Ratten um etwa 10% gegenüber einem Normalkollektiv.

2. Die gleichzeitige Gabe von Lithiumchlorid hatte nach 55 Tagen Versuchsdauer auf das Ausmaß der Verlangsamung des Gewichtsanstieges keinen Einfluß.

3. Alleinige Lithiumgabe hatte in der angewandten Dosis keinen Einfluß auf den Gewichtsanstieg wachsender Ratten.

4. TSH-Applikation über einen Zeitraum von 8 Wochen verursachte einen signifikanten Anstieg des Gesamtthyroxins im peripheren Blut wachsender Ratten um etwa 100% gegenüber einer Vergleichsgruppe. Dazu parallel fand sich eine signifikante Erhöhung der Serum-cAMP-Spiegel und des Normalisierten Thyroxin Quotienten (NTR).

5. Gleichzeitige Gabe von LiCl führte zu einer signifikanten Senkung der T_4- und cAMP-Spiegel in den Bereich der unbehandelten Kontrolle.

6. Lithium alleine senkte den cAMP-Spiegel signifikant gegenüber dem Vergleichskollektiv; eine ebenfalls vorhandene Reduzierung des Gesamtthyroxins ebenso wie eine Reduktion der NTR war nicht signifikant.

7. In der angewandten Dosis ließ sich mit TSH eine signifikante Gewichtszunahme der Schilddrüse erreichen. Histologisch fand sich aktives Parenchym mit hohem Epithel und entspeicherten Follikeln.

8. Zusätzliche Lithiumzufuhr steigerte die strumigene Wirkung von TSH. Histologisch zeigten sich hohe Epithelien mit gefüllten Follikeln, aber keine Kolloidtropfenbildung.

9. Alleinige Lithiumgabe ließ die Schilddrüsengewichte ebenfalls signifikant ansteigen. Histologisch waren die Epithelien abgeflacht bei kolloidhaltigen dilatierten Follikeln, es bot sich das Bild der sogenannten "ruhenden Schilddrüse".
   Bei den beiden mit LiCl behandelten Kollektiven fanden sich deutliche Zeichen eines gestörten Sekretionsprozesses.

10. T_4-Intoxikation verursachte eine signifikante Gewichtsreduktion gegenüber einer unbehandelten Vergleichsgruppe.

11. Bei zusätzlicher Lithiumgabe bestand eine weitere signifikante Gewichtsreduktion sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der Gruppe mit T_4-Intoxikation.

12. Alleinige Lithiumgabe führte zu keiner signifikanten Gewichtsreduktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

13. T_4-Gabe in der angegebenen Dosierung führte zu einem peripheren Hormonspiegel von im Mittel 32 µg/100 ml.

14. Bei zusätzlicher Lithiumapplikation lagen die Werte für T_4 im Mittel bei 35 µg/100 ml, waren aber gegenüber der ersten Gruppe nicht signifikant.

15. Alleinige Lithiumgabe erniedrigte den peripheren T_4-Spiegel.

16. Die Überlebensrate bei artefizieller Thyroxin-Intoxikation war bei gleichzeitiger Gabe von Lithium zu jedem Zeitpunkt geringer als bei alleiniger T_4-Gabe.

2. ACTH - Versuch

1. Durch ACTH konnte eine signifikante Verlangsamung des Gewichtsanstieges wachsender Ratten erzeugt werden; es resultierte ein Gewichtseinstand.

2. Bei gleichzeitiger Gabe von LiCl wurde das Ausmaß der Verlangsamung des Gewichtsanstieges signifikant verstärkt, so daß gegenüber dem Ausgangsgewicht sogar eine Gewichtsabnahme erfolgte.

3. Lithiumgabe alleine hatte in der angewandten Dosis keinen signifikanten Effekt auf den Gewichtsanstieg wachsender Ratten.

4. Durch ACTH konnte in der angewandten Dosis nach 17 Tagen ein signifikanter Anstieg des Serum-Corticosterons gegenüber dem Vergleichskollektiv erreicht werden; dem entsprach ein signifikanter Anstieg des Corticosterongehaltes der Nebennieren. Ebenfalls parallel ansteigende Serum-cAMP-Spiegel waren auf Grund der Streuung um den Mittelwert nicht signifikant.

5. Gleichzeitige Lithiumzufuhr führte zu einer Verstärkung der unter alleiniger ACTH-Applikation erzielten Effekte, wobei der Corticosterongehalt der Nebennieren sowie die Serum-cAMP-Spiegel auch gegenüber den nur mit ACTH behandelten Tieren signifikant erhöht waren.

6. Alleinige Lithiumgabe senkte den Corticosterongehalt der Nebennieren signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle; die ebenfalls vorhandene Senkung der Serum-cAMP- und -Corticosteron-Spiegel war nicht signifikant.

7. Mit ACTH ließ sich eine signifikante Gewichtszunahme der Nebennieren um bis zu 600% erzielen. Histologisch befanden sich die Organe im Zustand der sog. "progressiven Transformation"; in der H.E.-Färbung wirkten die Zellen optisch leer, die Fettfärbung zeigte einen reichlichen Lipoidgehalt.

8. Gleichzeitige Lithiumchloridzufuhr verstärkte die unter alleiniger ACTH-Gabe beobachtete Gewichtszunahme der Nebennieren wachsender Ratten. Makroskopisch fanden sich hämorrhagische Organe von blau-violetter Färbung; histologisch zeigte sich die Gewebetextur zerstört mit nekrobiotisch veränderten Rindenzellen (hämorrhagische Infarzierung).

9. Lithium alleine bewirkte ebenfalls einen signifikanten Gewichtsanstieg der Nebennieren. Die Zellen wirkten besonders gegenüber den nur mit ACTH stimulierten Organen optisch dichter, eine Lipoidvermehrung fand sich nicht, die Retikulariszellen waren relativ klein.

IV. Diskussion der Ergebnisse

TSH-/T_4-Versuch:

1. Erwartungsgemäß kam es bei TSH-induzierter Hyperthyreose durch die Steigerung des Gesamtmetabolismus und des Sauerstoffverbrauchs zu einer Verlangsamung des Gewichtsanstieges der wachsenden Ratten.

   Die Gewichtszunahme der Schilddrüse um 66% gegenüber der unbehandelten Kontrolle sowie der histologische Befund (aktives Parenchym, entspeicherte Follikel) waren entsprechend. Die Parallelität erhöhter Gesamtthyroxin- und Serum-cAMP-Spiegel sowie die NTR-Erhöhung deuten daraufhin, daß die TSH-Wirkung auf die Schilddrüse auch bei chronischer Applikation zumindest zum Teil über die membrangebundene Adenylcyclase vermittelt wird. 1968 berichteten GILMAN u. RALL über eine entsprechende Erhöhung der cAMP-Konzentration im intakten Schilddrüsengewebe nach Stimulation mit TSH. Sowohl bei in vitro Versuchen mit 50 mU TSH/ml Inkubationsmedium, als auch bei in vivo Versuchen mit i.v. Injektion von 50 mU TSH stiegen die cAMP-Konzentrationen in Schilddrüsen von Ratten von im Mittel 6-14 pMol/mg Gewebe um das 2-3 fache auf Werte zwischen 20 und 33 pMol/mg Gewebe an (ZAKARIJA u. McKENZIE 1973). Dem widersprechen auch nicht die Befunde von SHUMAN et al. (1976), die bei wiederholter Inkubation von Schilddrüsenhomogenaten in einem TSH-haltigen Inkubationsmedium eine herabgesetzte Fähigkeit des Adenylcyclase Systems beobachtet hatten, auf die Stimulation durch thyreotropes Hormon mit einer vermehrten cAMP Formation zu reagieren; die TSH-Zufuhr erfolgte hierbei nämlich in so kurzfristigen Abständen, daß die TSH-Rezeptoren vermutlich durch die erste TSH Inkubation noch besetzt oder der

Kopplungsmechanismus zwischen hormonellem Rezeptor und Adenylcyclase noch modifiziert war.

2. Nach 52 Tagen Versuchsdauer zeigt sich ein deutlicher Schutzeffekt des Kations Lithium bei TSH-Hyperthyreose, auch wenn dies hinsichtlich der Gewichtsentwicklung aufgrund der Streuung um die Mittelwerte nicht signifikant war. Die Parameter Gesamtthyroxin, Normalisierter Thyroxin Quotient und cyclisches AMP waren jedenfalls gegenüber den allein mit TSH behandelten Tieren signifikant reduziert.
   Bei Versuchen mit hypophysektomierten Ratten, denen TSH substituiert wurde, fanden BERENS et al. (1970) nach Lithiumapplikation ^{131}J-uptake und ^{131}J-Freisetzung aus der Schilddrüse erniedrigt; allerdings lagen die Serum-Lithium-Konzentrationen mit 3-4mVal/l schon im toxischen Bereich. Über den Angriffspunkt von Lithium an der Schilddrüse bei diesen toxischen Dosen waren die Angaben noch hypothetisch. WOLFF et al. (1970) konnten aber zeigen, daß die TSH stimulierte membrangebundene Adenylcyclase durch Lithium gehemmt werden konnte, so daß die Möglichkeit besteht, daß Lithium an dieser Stelle mit der TSH vermittelten Sekretion der Schilddrüsenhormone interferiert. Dies scheinen auch die Ergebnisse dieser Untersuchung nach chronischer Lithiumzufuhr mit Dosen im therapeutischen Bereich zu bestätigen. WILLIAMS et al. (1971) und KENDALL-TAYLOR (1972) berichteten allerdings, daß Lithium nicht nur die TSH vermittelte, sondern auch die durch das Dibutyryl-derivat von cyclischem AMP stimulierte Sekretion von ^{131}Jodhormonen hemmt und parallel dazu die Bildung von Kolloidtropfen (Endocytosis) in der Schilddrüse erniedrigt war, so daß man auch einen Angriffspunkt distal des Adenylcyclase Systems diskutieren muß.

Auch in der vorgelegten Arbeit fand sich histologisch bei gefüllten Follikeln keine Kolloidtropfenbildung bei insgesamt deutlichen Zeichen eines gestörten Sekretionsprozesses; die Schilddrüsengewichte selbst lagen noch über denen der Tiere, die nur mit TSH stimuliert worden waren, Lithium steigert die strumigene Wirkung von TSH.

3. Chronische alleinige Lithiumapplikation erhöhte im Tierversuch die Schilddrüsengewichte um im Mittel bis zu 30% gegenüber der unbehandelten Kontrolle und bewirkte eine Vergrößerung vom Kolloidstrumatyp. Dieser Befund bestätigt frühere Untersuchungen von HELTNE u. OLLERICH (1973). SEDVALL et al.(1968,1969) hatten aufgrund ihrer zur Klärung des Mechanismus der Lithiumwirkung auf die Schilddrüse durchgeführten klinischen Untersuchungen wegen der Verlängerung der thyreoidalen ^{131}J-Halbwertszeit gefolgert, daß Lithium die Jodabgabe aus der Schilddrüse blockiert. Die 1970 veröffentlichen Befunde aus dem Arbeitskreis von BERENS bestätigten und ergänzten diese erste Hypothese. Es fand sich eine Anreicherung von Lithium in der Schilddrüse, eine Reduzierung der thyreoidalen ^{131}Jodfreisetzungsrate um bis zu 80% bei Langzeitbehandlung von Ratten und die Entwicklung von Schilddrüsenvergrößerungen. Neuere biochemische Untersuchungen von RADVILA et al. (1976) unterstützten die in dieser Untersuchung dargestellten morphologischen Befunde (s. Abb. 20 und entsprechende Legende). Bei Ratten, die zur Erniedrigung ihres Thyreoglobulingehaltes mit Propylthiouracil vorbehandelt worden waren, verursachte Lithium innerhalb von 3 Tagen eine signifikante Wiederauffüllung der Follikel mit Thyreoglobulin. Dieser Effekt konnte durch Jodide potenziert werden, die allein jedoch nur einen Randeffekt haben. Nach RADVILA liegt das daran, daß der Haupteffekt der Jodide in einer Hemmung der

Thyreoglobulinsynthese und weniger in einer Hemmung des Abbaus zu sehen ist, während Lithium eine potenter Inhibitor der Thyreoglobulinhydrolyse ist. Diese Befunden stimmen auch mit klinischen Beobachtungen über die synergistische Wirkung von Jod und Lithium überein (SHOPSIN et al. 1973, JORGENSEN et al. 1973).

Bezüglich der peripheren Schilddrüsenhormonspiegel sind die Befunde unterschiedlich. Während in dieser Untersuchung die cAMP-Spiegel signifikant erniedrigt waren, konnte die Erniedrigung der peripheren Thyroxinspiegel unter Lithium um im Mittel 24% wegen der Streuung um den Mittelwert nicht als signifikant bezeichnet werden. Diese Befunde stimmen mit den tierexperimentellen Untersuchungen von SEDVALL et al. (1968) und LJUNGREN et al. (1971) überein, bei denen nur ein relativ geringer Abfall der Hormonspiegel gefunden wurde. BERENS u. Mitarbeiter (1970) sowie MÄNNISTÖ et al. (1971) haben einen Abfall der peripheren Hormone überhaupt nicht gesehen.

Auch beim Menschen wurden in einer ganzen Reihe von Untersuchungen ein nur geringer und nicht immer signifikanter Abfall des PBJ und Gesamtthyroxin gefunden (SCHOU et al. 1968, COOPER et al. 1969, SEDVALL et al. 1968, LAZARUS u. BENNIE 1972). Prospektive Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven, die auch die Bestimmung des Trijodthyroxin miteinbezogen, haben auch eine Veränderung der basalen T_3-Spiegel unter Lithium nicht nachweisen können (LAURIDSEN et al. 1974, McLARTY 1975). Mit der Bestimmung der NTR scheint auch der von der Kapazität des Thyroxin-Binding-Protein unabhängige Teil des freien Thyroxin nach Lithium unter basalen Bedingungen unverändert.

4. Bei artefizieller Thyroxin-Intoxikation hat Lithium hinsichtlich der Stoffwechselwirkung gemessen am Abfall des Körpergewichtes einen verstärkenden Effekt. Lithium war nicht in der Lage, den artefiziell erhöhten peripheren T_4-Spiegel nach T_4-Gabe zu senken; die Mittelwerte stiegen unter Lithium bei T_4-Intoxikation eher an. Dieser Befund zeigt, daß durch Lithium die metabolische Halbwertszeit von T_4 möglicherweise über eine Hemmung der Dejodination verlängert wird. TEMPLE et al. (1972 b) haben zuerst vermutet, daß die Änderung der verschiedenen Parameter (erniedrigte Jodfreisetzungsrate, Abfall der ^{131}J-Serumkonzentration und ^{131}J-Urinausscheidung sowie des Serumthyroxinjods) nicht in allen Fällen durch die verminderte Jodfreisetzungsrate zu erklären sei, sondern möglicherweise ein extrathyreoidaler peripherer Lithiumeffekt, nämlich eine verzögerte T_4-Plasmaclearance eine Rolle spiele. MÄNNISTÖ (1974) konnte einen gesteigerten renalen oder fäkalen Verlust von Hormonjod unter Lithium im tierexperimentellen Lithiumlangzeitversuch ausschließen. Nach den Untersuchungen dieses Autors liegt eine deutliche Verzögerung des T_4-Abbaus durch Leber- und Nierenhomogenate vor, die Dejodination insbesondere intrathyreoidal ist jedoch unverändert. Auch die Plasmaclearance von ^{125}J-TSH unter Lithium war unverändert. SABERI und UTIGER (1975) haben die periphere Konversion von T_4 zu T_3 bei hypothyreoten thyroxinsubstituierten Patienten untersucht und fanden keine Veränderungen der Serum-T_3-Spiegel unter Lithium; sie schlossen daraus, daß die Verlängerung der Plasmaclearance von T_4 nach Lithiumapplikation durch andere Mechanismen als durch die Hemmung der peripheren Konversion zustande kommen müsse, wenn nicht gleichzeitig der T_3-Abtransport in gleichem Maße erniedrigt sei.

ACTH - Versuch

1. Bei den allein mit ACTH behandelten Ratten kam es aufgrund der Stimulation der glucocorticoiden Nebennierenrindentätigkeit zu einem Gewichtseinstand. Im Proteinstoffwechsel haben die Glucocorticoide eine katabole Wirkung, indem sie außer in der Leber die Proteinbiosynthese hemmen und den Proteinabbau in Muskel, Knochen und lymphatischen Organen stimulieren; die vermehrt freigesetzten Aminosäuren werden in der Leber zur Gluconeogenese verwendet, der freigesetzte Stickstoff als Harnstoff ausgeschieden, die Stickstoffbilanz wird negativ.

Die vorgelegte Untersuchung bestätigt die Ergebnisse von GRAHAME-SMITH et al. (1967), wonach bei Ratten ansteigende ACTH-Konzentrationen im intakten Nebennierengewebe ebenfalls ansteigende cAMP-Spiegel und proportional dazu einen Anstieg der Steroidbildung erzeugten. COTE et al. (1975) fanden bei unreifen Ratten, die im Vergleich zu dieser Untersuchung mit der 5-fachen Menge ACTH behandelt worden waren, erhöhte cAMP- und Corticosteronspiegel während der gesamten Versuchsdauer. Die nicht signifikant erhöhten cAMP-Spiegel und die signifikant erhöhten Corticosteronkonzentrationen in Serum und Nebennierengewebe scheinen aber auch darauf hinzuweisen, daß cAMP zur Entfaltung der ACTH-Wirkung auf die Steroidgenese nur bedingt erforderlich ist.

MOYLE et al. (1973) fanden in Nebennierenzellsuspensionen die cAMP-Spiegel auf basalen Werten, bis die ACTH-stimulierte Steroidgenese mehr als 50% der erreichbaren Werte betrug. RICHARDSON et al. (1973) zeigten, daß in Ultrahomogenaten isolierter Nebennierenzellen niedrige ACTH-Dosen eine merkliche, aber submaximale Steroidantwort provozierten, ohne eine eindeutige Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinaseaktivität bewirken zu können.

Bei ACTH-Dosen, die 10mal höher als die, die zu einer maximalen Steroidstimulation erforderlich waren, war die Proteinkinaseaktivität nach 1. Min. um das Zweifache und nach 3 Min. um das Dreifache gegenüber den Kontrollsuspensionen erhöht. WHITLEY et al. (1975) demonstrierten an hypophysektomierten Ratten einen dosisabhängigen Anstieg des adrenalen cAMP nach ACTH-Zufuhr, wobei mit 0,05 mU ACTH eine gerade noch meßbare Steroidformation in Gang gesetzt werden konnte.

Der verstärkten Steroidausschüttung aus den Nebennieren entsprachen der Gewichtsanstieg der Organe und das histologische Bild der "progressiven Transformation" der Rindenzellen.

2. Lithium verstärkte in der angewandten Dosis den ACTH-Effekt auf das Körpergewicht signifikant. Die Nebennieren waren stark alteriert, die Gewebetextur zerstört; bezogen auf 100 g Körpergewicht lagen die Organgewichte um das 10-fache über denen der unbehandelten Kontrollen und um bis zu 50% über den allein mit ACTH stimulierten Organen.

Dem entsprach eine signifikante Erhöhung der Corticosteronkonzentrationen der Nebennieren, des Serums und parallel dazu ein Anstieg der peripheren cAMP-Spiegel gegenüber den nur mit ACTH behandelten Tieren wie auch gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dagegen berichteten HALMI et al. (1974) über eine Blockierung der ACTH-stimulierten Adenylcyclase in Nebennierenhomogenaten von Ratten durch 25 mMol Lithium. TEMPLE u. WOLFF (1973) fanden bei in vitro Versuchen mit Lithiumkonzentrationen von 2-10 mMol im Inkubationsmedium eine zunehmende Blokkierung der durch 15 mU/ml ACTH vermittelten Steroidsekretion und -synthese aus Y-1 Nebennierentumorzellkulturen der Maus. BERENS u. WOLFF (1975) diskutierten

auch eine Blockade der Nebennierenrindenfunktion distal des ACTH-Rezeptors, da nach einer unveröffentlichten Beobachtung von WOLFF u. COOK (zit. n. BERENS u. WOLFF 1975) auch die cAMP vermittelte Steroidsekretion durch Lithium gehemmt werden konnte. Die angewandten Lithiumdosen der zitierten Untersuchungen liegen allerdings schon zum Teil weit im toxischen Bereich, ein Vergleich mit der vorgelegten Arbeit über chronische Effekte von Lithium bei therapeutischen Serumkonzentrationen ist daher nur bedingt möglich.

Beim Menschen fanden HALMI et al. (1972) unter Lithiumbicarbonat, bedingt durch leicht erniedrigte morgendliche Werte, eine Nivellierung des circadianen Rhythmus der Plasmacortisolspiegel. Unter Suppression mit Dexamethason war die Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde im ACTH-Test unverändert. In einer Untersuchung an 8 gesunden Freiwilligen fanden GERDES et al. (1977) dagegen 4-8 Stunden nach einmaliger i.v. Infusion einer Maximaldosis von 80 IU ACTH nach 14 tägiger Gabe von 500 mg Lithiumcarbonat/die eine signifikant verzögerte Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde.

3. Der Gewichtsanstieg der Nebennieren der allein mit Lithium behandelten Tiere um etwa 30% gegenüber den Kontrollen bestätigt die Beobachtungen von KRULIK (1971), der nach 3-tägiger subcutaner Lithiumapplikation über einen Anstieg der Nebennierengewichte bei Ratten um 34% berichtet hatte.

Funktionell bestehen zwischen der stimulierten und der unstimulierten Nebennierentätigkeit unter Lithium erhebliche Unterschiede. Unter Basalbedingungen war der möglicherweise ACTH unabhängige Anteil der Corticosteronsynthese und der Corticosteronsekretion, gemessen an peripheren und intraadrenalen Hormonspiegeln im Langzeitversuch unter Lithium bei der Ratte blockiert. In Y-1

Nebennierentumorzellen von Mäusen fanden TEMPLE u. WOLFF (1973) nach Inkubation mit 10 mMol Lithium eine Senkung der basalen Steroidsekretion um 16,6%. Dagegen konnte KRULIK (1970) bei Ratten nach Gabe von 2 mMol LiCl/kg/die nach 10 Tagen keine Veränderungen im Gehalt der Nebennieren an Cholesterin sowie den Corticosteronspiegeln in Serum und Urin nachweisen. Nach Applikation von 5 mMol LiCl/kg/die über 10 Tage fand sich zwar eine Erhöhung der Corticosteronausscheidung im Urin, der Cholesteringehalt der Nebennieren sowie die peripheren Corticosteronspiegel blieben jedoch unverändert. Derselbe Autor fand jedoch 1971 unter ähnlichen Versuchsbedingungen nach zweimaliger täglicher Gabe von 2,5 mMol LiCl/kg s.c. schon nach 3 Tagen eine Erhöhung der Aldosteronproduktion aus 4- ^{14}C-Progesteron um 131% und berechnet auf 100 mg Nebennierengewebe um 80,8%. Mit toxischen Lithiumdosen, die Ratten über eine Magensonde zugeführt wurden, fanden HERTING et al.(1977) dagegen neben der Aldosteronerhöhung im peripheren Blut auch eine Erhöhung der Serum-Corticosteronspiegel, die sich parallel zu den ansteigenden Serum-Lithiumspiegeln verhielten.

V. Zusammenfassung und Schluß

1. TSH-/T_4-Versuch

Lithiumapplikation hat bei TSH-induzierter Hyperthyreose durch eine Blockierung der Hormonsekretion aus der Schilddrüse eine deutliche protektive Wirkung. Dieser Effekt scheint zumindest zum Teil über die membrangebunde Adenylcyclase und deren physiologisches Substrat, das 3',5'-cyclo AMP, vermittelt zu sein. Lithiumapplikation allein wirkt strumigen, die strumigene Wirkung von TSH wird durch Lithium verstärkt. Daneben hat Lithium auch einen morphologisch nachweisbaren Angriffspunkt an der Schilddrüse (Follikelfüllung, Endocytosis etc.).

Für den klinischen Gebrauch bedeutet das, daß Lithium abgesehen von anorganischem Jod das einzige Therapeutikum ist, das die Jodfreisetzung aus der Schilddrüse akut blockieren kann. Erste Mitteilungen stammen von BURROW et al. (1971), TEMPLE et al. (1972), SPAULDING et al. (1972) und GERDES et al. (1973). Bedenkt man allerdings, daß anorganisches Jod in der Regel in der Schilddrüse akkumuliert und als Substrat der Schilddrüsenhormonbildung metabolisiert wird und zusätzlich Probleme auch hinsichtlich seiner Interferenz mit einer Anzahl diagnostischer Untersuchungen der Schilddrüsenfunktion auftreten können, so scheint Lithium in der Therapie der akuten thyreotoxischen Krise, bei der eine rasche Sekretionshemmung erwünscht ist, das Mittel der Wahl zu sein.

Extrathyreoidal bewirkt Lithium dagegen bei artefizieller T_4-Intoxikation über eine Verlängerung der metabolischen Halbwertszeit von Schilddrüsenhormonen durch die Hemmung der Dejodination eher einen Anstieg der peripheren Thyroxinspiegel. Hinsichtlich der Überlebensrate bei artefizieller T_4-Intoxikation hat Lithium einen negativen Effekt. Danach

hat Lithium bei artefizieller Thyroxinintoxikation keine protektive Wirkung; Lithiumapplikation bei Krankheitsbildern wie der Hyperthyreosis Factitia sollte als kontraindiziert betrachtet werden.

2. ACTH - Versuch

Lithium supprimiert unter basalen Bedingungen im Langzeitversuch den möglicherweise ACTH-unabhängigen Anteil der Synthese und Sekretion von Corticosteron. Eine Hemmung der membrangebundenen Adenylcyclase als Angriffspunkt der Lithiumwirkung ist möglich, aber nicht bewiesen; die gleichzeitige Erniedrigung von cyclischem AMP und Corticosteron spricht zumindest nicht gegen ein solches Konzept.

Die Auffassung von HALMI et al. (1972), daß die Ansprechbarkeit der Nebennierenrinde auf ACTH unverändert sei, muß revidiert werden. Zumindest bei Dauerstimulation scheint Lithium zu einer so hochgradigen Veränderung der Zellmembraneigenschaften zu führen, daß letztlich eine Zerstörung der Zelle resultiert und wahrscheinlich dadurch über einen kurzen Zeitraum ein vermehrter Einstrom von NNR-Zellsekretionsprodukten meßbar wird.

Durch die experimentellen Untersuchungen wird nicht bewiesen, daß diese Lithiumwirkung mit klinischen Veränderungen bei Patienten im Zusammenhang stehen. Die benutzten Tiermodelle sind z.T. nicht auf den Menschen übertragbar, da das Hauptversuchstier Ratte eine so relativ strenge Trennung der verschiedenen Partialfunktionen der Nebennierenrinde wie der Mensch nicht aufweist. Das wesentliche Nebennierenrindensteroidhormon der Ratte ist das Corticosteron, welches in erster Linie ein potentes Mineralocorticoid ist. Viele Zusammenhänge mit parallelen Veränderungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt (BAER et al. 1973), die durch die lithium-

induzierte Änderung der Wirkung von Adiuretin zustande kommen können (HERTING et al. 1977) sowie die Korrelationen mit dem Renin-Angiotensin-System bedürfen noch weiterer Abklärung. Die Versuche beweisen aber, daß ähnliche eingreifende Veränderungen in Funktion und Morphologie wie an der Schilddrüse auch an der Nebennierenrinde unter Lithium beobachtet werden können.

Diese Beobachtungen über veränderte Funktion und Morphologie der Nebennierenrinde im stimulierten und nicht stimulierten Zustand unter Lithium scheinen aber aus 3 Gründen von Bedeutung zu sein:

a) sie dienen zur Aufklärung der Symptomatologie der Nebenwirkungen einer Lithiumtherapie,

b) sie müssen in der Diskussion der Lithiumwirkung bei den affektiven Psychosen berücksichtigt werden,

c) bei genauerer Erforschung der Wirkungsrichtung sind die lithium-induzierten Einflüsse möglicherweise bei primären Erkrankungen der Nebennierenrinde therapeutisch nutzbar.

IV. Literaturverzeichnis

BAER, L., GLASSMAN, A.H., KASSI, S.:
Negative sodium balance in lithium carbonate toxicity. Evidence of mineralocorticoid blockade.
Arch. Gen. Psychiatry 29, 823, 1973

BERENS, S.C., WOLFF, J., MURPHY, D.L.:
Lithium concentration by the Thyroid.
Endocrinology 87, 1085, 1970 a

BERENS, S.C., BERNSTEIN, R.S., ROBBINS, J., WOLFF, J.:
Antithyroid effects of lithium.
J. Clin. Invest. 49, 1357, 1970 b

BERENS, S.C., WILLIAMS, J.A., WOLFF, J.:
Dissociation of thyrotropin glands by lithium.
Biochim. Biophys. Acta 252, 314, 1971

BERENS, S.C., WOLFF, J.:
The endocrine effects of lithium.
In: Lithium research and therapie.
Ed.: F.N. JOHNSON, Academic Press, London 1975

BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., RODBELL, M.:
Adenyl cyclase in fat cells.
J. biol. Chem. 244, 3468, 1969

BROOKBANK, B.W., COPPEN, A.:
Plasma 11-hydroxycorticosteroids in affective disorders.
Br. J. Psychiatry 113, 395, 1967

BRAMBILLA, F., NUREMBERG, T.:
Adrenal cortex function of cyclothymic patients in depressive phase.
Dis. nerv. Syst. 24, 727, 1963

BURROW, G.N., BURKE, W.R., HIMMELHOCH, J.M.,
SPENCER, R.P., HERSHAM, J.M.:
Effect of lithium on thyroid function.
J. clin. Endocrinol. Metabolism 32, 647, 1971

BUNNEY, W.E., MASON, J.W., HAMBURG, D.A.:
Correlations between behavioral variables and
urinary 17-hydroxycorticoids in depressed patients.
Psychosom. Med. 27, 299, 1965

BUSH, I.E.:
The chromatography of steroids.
Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1961

COOPER, T.B., SIMPSON, G.M.:
Preliminary report of a longitudinal study on the
effect of lithium on iodine metabolism.
Curr. ther. Res. 11, 603, 1969

COOPER, T.B., WAGNER, B.M., KLINE, N.S.:
Contribution to the mode of action of lithium on
iodine metabolism.
Biol. Psychiatr. 2, 273, 1970

COTE, T.E., YASUMARA, S.:
Effect of ACTH and Histamine stress on serum corti-
costerone and adrenal cyclic AMP levels in immature rats.
Endocrinology 96, 1044, 1975

CROWE, M.J., LLOYD, G.G., BLOCH, S., ROSSER, R.M.:
Hypothyreoidism in patients treated with lithium:
a review and two case reports.
Psychol. Med. 3, 337, 1973

DOUSA, T.P.:
Lithium interaction with ADH dependant cyclic AMP
system of human renal medulla.
Clin. Res. 21, 282, 1973

EMERSON, G.H., DYSON, W.L., UTIGER, R.D.:
Serum thyrotropin and thyroxine concentrations in patients receiving lithium carbonate.
J. clin. Endocrinol. Metab. 36, 338, 1973

FANN, W.E., DAVIS, J.M., JANOWSKY, D.S., KAUFMANN, J.S., GRIFFITH, J.D.:
Effect of lithium on adrenergic function in man.
J. clin. Pharmacol. Ther. 13, 71, 1972

GERDES, H., LITTMANN, K.P., JOSEPH, K., MAHLSTEDT, J.:
Die Behandlung der Thyreotoxikose mit Lithium.
Dtsch. med. Wschr. 98, 1551, 1973

GERDES, H.:
Nebenwirkungen und Wirkungen der Lithiumtherapie beim Menschen im Bereich des Endokriniums.
Internist 14, 175, 1973

GERDES, H., SCHOLLMEIER, B., SCHEUER, A., SPUCK, W.:
Experimental studies about the effect of lithium on ACTH-stimulated adrenals
Acta Endocrinol. Suppl. 1977

GERDES, H.:
Lithium und Endokrinium.
im Druck, 1977

GIBBONS, J.L.:
Cortisol secretion rate in depressive illness.
Arch. Gen. Psychiatry 10, 572, 1964

GILLMAN, A.G., RALL, T.W.:
Factors influencing adenosine 3'5'-phosphate accumulation in bovine Thyroid sclices.
J. Biol. Chem. 243, 5867, 1968

GOMEZ-SANCHEZ, C., MURRY, B.A., KEM, D.C., KAPLAN, N.M.:
A direct radioimmunoassay of corticosterone in rat serum.
Endocrinology 96, 796, 1975

GRAHAME-SMITH, D.G., BUTCHER, R.W., NEY, R.L., Sutherland, E.W.:
Adenosine 3',5'-Monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotropic hormone on the adrenal cortex.
J. Biol. Chem. 242, 5535, 1967

GREENGARD,P., ROBISON, G.A. (eds.):
Advances in cyclic nucleotide.
Research, Vol. 3, Raven Press New York, 1973

HALMI, K.A., NOYES, R.:
Effect of lithium on thyroid function.
Biol. Psychiat. 5, 211, 1972

HALMI, K.A., NOYES, R., MILLARD, S.A.:
Effect of lithium on plasma cortisol and adrenal response to adrenocorticotropin in man.
Clin. pharmacol. Therap. 13, 699, 1972

HALMI, K.A., HALMI, N.S., ANDERSON, D.J. (1974):
zit. nach BERENS u. WOLFF
in: Lithium Research and Therapie s.dort

HELTNE, C.E., OLLERICH, D.A.:
Morphometric electronmicroscopic studies of a goiter induced by lithium in the rat
Amer. J. Anat. 136, 297, 1973

HERTING, T., LUCKE, Ch., ERBLER, H.C.:
Der Einfluß von Lithium auf die Plasmaspiegel von Vasopressin, Corticosteron, Aldosteron und die Renin-Aktivität der Ratte
Acta Endocrinol. Supplement 1977

JOHNSON, F.N.:
Lithium research and therapie
Academic Press, London - New York 1975

JORGENSEN, J.V., BRANDRUP, F., SCHROLL, M.:
Possible synergism between iodine and lithium carbonate.
J. Amer. med. Ass. 223, 192, 1973

KENDALL-TAYLOR, P.:
Comparison of the effect of various agents on thyroidal adenyl cyclase activity with their effect on thyroid hormone release.
J. Endocrinol. 54, 137, 1972

KRULIK, R., ZVOLSKY, P.:
The influence of lithium ion on the adrenocortical function of rats.
Arzneim.Forschung 20, 1577, 1970

KRULIK, R.:
Effect of lithium on aldosterone production by rat adrenals.
Arzneim. Forschung 21, 889, 1971

LAURIDSEN, U.B., KIRKEGAARD, C., NERUP, J.:
Lithium and the pituitary-thyroid axis in normal subjects.
J. clin. Endocrinol. Metab. 39, 383, 1974

LAZARUS, J.H., BENNIE, E.H.:
Effect of lithium on thyroid function in man.
Acta Endocrinol. 70, 266, 1972

LINDSTEDT, G., LUNDBERG, P.A., TOFFT, M.,
AKESSON, H.O., ÖHMAN, R.:
Serum thyrotropin and hypothyreoidism during lithium therapy.
Clin. Chim. Acta 48, 127, 1973

LJUNGREN, J.C., SEDVALL, G., LEVIN, K., FYRÖ, B.:
Influence of lithium ion on the biosynthesis of thyroxine and thyreoglobuline in the rat.
Acta Endocrinol. 67, 784, 1971

MÄNNISTÖ, P.T., LINNOILA, M., LEPPÄLUOTO, J.:
Studies with lithium in euthyrotic, hyperthyrotic and hypothyretic rats.
Life Sci. 10, 9, 1971

MÄNNISTÖ, P.T., LEPPÄLUOTO, J., VIRKKUNEN, P.:
Complex antithyroid properties of the lithium ion.
Acta Endocrinol. 74, 492, 1973

MÄNNISTÖ, P.T.:
Inhibitory effect of lithium on uptake and incorporation of tyrosine into protein in three thyroid preparations in vitro
Med. Biol. 52, 250, 1974

McLARTY, D.G., O'BOYLE, J.H., SPENCER, C.A., RATCLIFFE, J.G.:
Effect of lithium on hypothalamic-pituitary-thyroid function in patients with affective disorders.
Brit. Med. J. 3, 623, 1975

MOYLE, W.R., KONG, Y.C., RAMACHANDRAN, J.:
Steriodogenesis and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat adrenal cells.
J. Biol. Chem. 248, 2409, 1973

MURPHY, B.E.P., PATTEE, C.J.:
Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding.
J. clin. Endocrinol. Metab. 24, 187, 1964

PLATMAN, S.R., FIEVE, R.R.:
Lithium carbonate and plasma cortisol response in affective disorders
Arch. Gen. Psychiatry 18, 591, 1968

RADVILA, A., ROOST, R., BÜRGI, H., KOHLER, H., STUDER, H.:
Inhibition of thyroglobulin biosynthesis and degradation by excess iodide.
Acta Endocrinol. 81, 495, 1976

RANDERATH, K.:
Dünnschicht-Chromatographie.
Verlag Chemie, Weinheim 1962

RICHARDSON, M.C., MACKIE, C., SCHULSTER, D.:
Stimulation by adrenocorticotropin of adenosine 3',5'-monophosphate levels and adenosine 3',5'-monophosphate dependant protein kinase activity in isolated rat adrenal cells.
J. Endocrinology 65, 1975 Nr. 3

RIZZO, N.D., FOX, H.M., LAIDLOW, J.C.:
Concurrent observations of behavior changes and of adrenocortical variations in a cyclothymic patient during period of 12 months.
Ann. Intern. Med. 41, 798, 1954

ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.:
Cyclic AMP.
Ann. Rev. Biochem. 37, 149, 1968

ROSENSWEIG, N.S., HENDRIX, T.R.:
The differential effects of sodium, lithium and potassium on the absorption of glucose, xylose and water from rat jejunum in vivo.
John Hopkins Med. J. 121, 412, 1967

SABERI, M., UTIGER, R.:
Lack of effect of lithium on serum thyroxine and triiodothyronine levels and thyrotropin secretion in thyroxine treated hypothyroid patients.
Horm. Metab. Res. 7, 361, 1975

SACHAR, E.J., HELLMAN, L., KREAM, J., FUKUSHIMA, D.K., GALLAGHER, T.F., BROUX, N.Y.:
Effect of lithiumcarbonate therapy on adrenocortical activity.
Arch. Gen. Psychiatry 22, 304, 1970

SACHS, L.:
Statistische Methoden, 2. neubearb.Aufl.
Berlin-Heidelberg-New York 1972

SCHEUER, A., MÜLLER, R., MOSEBACH, K.O., GERDES, H.:
Die Verwendung von Kieselgel-Mikrosäulchen für einen einfachen chromatographischen Steroid-RIA.
Vortrag auf dem V. Colloquium Endocrinologicum südwestdeutscher Arbeitsgruppen, Marburg 1976

SCHOU, M.:
Biology and pharmacology of the lithium ion.
Pharmacol. Rev. 9, 17, 1957

SCHOU, M., AMDISEN, A., JENSEN, S.E., OLSEN, T.:
Occurence of goiter during lithium treatment.
Brit. Med. J. 3, 710, 1968

SCHWARTZ, M., MANDELL, A., GREEN, R., FERMAN, R.:
Mood, motility and 17-hydroxycorticoid excretion. A polyvariable case study.
Brit. J. Psychiat. 112, 149, 1966

SEDVALL, G.B., JÖNSSON, B., PETTERSSON, U., LEVIN, K.:
Effect of lithium salts on plasma bound iodine and uptake of ^{131}J in thyroid gland of man and rat.
Life Sci. 7, 1257, 1968

SEDVALL, G.B., JÖNSSON, B., PETTERSSON, U.:
Evidence of an altered thyroid function in man during treatment with lithium carbonate.
Acta Psychiatr. Scand. Suppl. 207, 59, 1969

SHOPSIN, B., BLUM, M., GERSHON, S.:
Lithium induced thyroid disturbance case report and review.
Compr. Psychiat. 10, 215, 1969

SHOPSIN, B., SHENKMAN, L., BLUM, M., HOLLANDER, S.C.:
Iodine and lithium induced hypothyroidism.
Amer. J. Med. 55, 695, 1973

SHUMAN, S.J., ZOR, U., CHAYOTH, R., FIELD, J.B.:
Exposure of thyroid slices to thyroid stimulating hormone induces refractoriness of the cyclic AMP system to subsequent hormone stumulation.
J. clin. Invest. 57, 1132, 1976

SINGER, J., ROTENBERG, D.:
Mechanism of lithium action.
New Engl. J. Med. 254, 1973/2

SPAULDING, S.W., BURROW, G.N., BERMUDEZ, F., HIMMELHOCH, J.M.:
The inhibitory effect on thyroid hormone release in both euthyroid and thyrotoxic patients.
J. clin. Endocrinol. Metab. 35, 905, 1972

STEINER, A.L., PAGLIARA, A.S., CHASE, L.R., KIPNIS, D.M.:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides II. Adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids.
J. Biol. Chem. 247, 1114, 1972

SUTHERLAND, E.W., ØYE, J., BUTCHER, R.W.:
The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action.
Rec. Progr. Horm. Res. 21, 623, 1965

TEMPLE, R., BERMAN, M., CARLSON, H.E., ROBBINS, J., WOLFF, J.:
The use of lithium in Grave's disease.
Mayo Clin. Proc. 47, 872, 1972 a

TEMPLE, R., BERMAN, M., ROBBINS, J., WOLFF, J.:
The use of lithium in the treatment of thyrotoxicosis.
J. clin. Invest. 51, 2746, 1972 b

TEMPLE, R., WOLFF, J., 1973 zit.nach BERENS u. WOLFF aus Lithium research and therapie s. dort

TOVEY, K.C., OLDHAM, K.G., WHELAN, J.A.M.:
A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique.
Clin. Chim. Acta 56, 221, 1974

VENDSBORG, P.B., VILSTRUP, H.:
The influence of lithium on carbohydrate and lipid metabolism in the perfused rat liver.
Acta pharmacol.(Kbh) 38, 10, 1976

VESCEI, P.:
Corticosteronextraktion in: Methods of Hormone Radioimmunoassay by JAFFE, R. u. BEHRMAN, H.R. (eds.), Academic Press New York, 1974

VESTERGAARD, P.A., POULSEN, J.C.:
Myxoedema - possible side - effect of lithium
Lancet (2), 427, 1972

WHITLEY, T.H., STOWE, N.W., ONG, S.-H., NEY, R.L.:
Control and localisation of rat adrenal cyclic guanosine 3',5'-monophosphate.
J. clin. Invest. 56, 146, 1975

WILLIAMS, J.A., BERENS, S.C., WOLFF, J.:
Thyroid secretion in vitro: Inhibition of TSH and dibutyryl-cyclic AMP stimulated ^{131}J-release by lithium.
Endocrinology 88, 1385, 1971

WOLFF, J., BERENS, S.C., JONES, A.B.:
Inhibition of thyreotropin stimulated adenylcyclase activity of beef thyroid membrane by low concentrations of lithium.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39, 77, 1970

ZAKARIJA, M.,McKENZIE, J.M.:
Cyclic AMP and its binding protein in the stimulated thyroid of the rat.
Life Sci. 12, 225, 1973

Verwendete Reagentien und Geräte

Aldosteron [11ß, 21-Dihydroxy-3,20-dioxopregnen-(4)-al-(18), 11-18 halbacetal] $C_{21}H_{28}O_5$

Androsteron [3α -Hydroxy-5α-androstanon-(17)] $C_{19}H_{30}O_2$

Cholesterin [Cholesten-(5)-ol-(3ß)] $C_{27}H_{46}O$

Corticosteron [11ß, 21-Dihydroxypregnen-(4)-dion-(3,20)] $C_{21}H_{30}O_4$

Dehydro-epi-androsteron [3ß-Hydroxyandrosten-(5)-on-(17)] $C_{19}H_{28}O_2$

11-Desoxycorticosteron [21-Hydroxypregnen-(4)-dion-(3,20)] $C_{21}H_{30}O_3$

11-Desoxycortisol [17α, 21-Dihydroxypregnen-(4)-dion-(3,20)] $C_{21}H_{30}O_4$

Hydrocortison [11ß, 17α, 21-Trihydroxypregnen-(4)-dion-(3,20)] $C_{21}H_{30}O_5$

Östradiol {Östradien- [1,3,5 (10)] -diol-(3,17ß)} $C_{18}H_{24}O_2$

Progesteron [Pregnen-(4)-dion-(3,20)] $C_{21}H_{30}O_2$

alle Fa. E. Merck, Darmstadt, zur biochemischen Forschung

Adenosin 3',5'-cyclic Phosphate [8-^{3}H] , in Äthanol/Wasser Reinheit - 97%. 250 µCi, Schwarz/Mann B-D R

Cyclic AMP assay kit, the Radiochemical Centre, Fa. Amersham Buckinghamshire, England

Cyclisches AMP Radioimmunoassay-Kit (^{125}J), Fa. Schwarz/Mann B-D R

[1,2,6,7(n)-^{3}H] Corticosteron in Benzol/Äthanol Lsg., 250 µCi, Fa. Amersham/Buchler, Braunschweig

[1,2,6,7(n)-^{3}H] Cortisol in Benzol/Äthanol Lsg., 250 µCi, Fa. Amersham/Buchler, Braunschweig

Desoxy [1α, 2α(n)-^{3}H] corticosteron in Benzol/Äthanol Lsg., 250 µCi, Fa. Amersham/Buchler, Braunschweig

Thyropac-5, Fa. Amersham/Buchler, Braunschweig

Lithiumchlorid, Dauelsberg u. Co., Penicillingesellschaft, Göttingen

L-Thyroxin "Henning", Dr. Henning, Berlin

Synacthen Depot, CIBA AG, Wehr/Baden

Thyreostimulin (TSH), Organon GmbH, München

Aluminiumoxid neutral (Aluminiumoxid 90, aktiv neutral), E. Merck

Ammoniumsulfat p.A., Schwarz / Mann B-D

Äthanol p.A. absolut, E. Merck

Äthylacetat p.A., E. Merck

Benzol thiophenfrei purum, Fluka AG, Buchs SG

Boratpuffer, 0,05 M pH 7,8

Dextran pharm. pyrogenfrei, Serva, Heidelberg

Dichlormethan, Baker analyzed Reagent, Baker Chemicals D.V., Deventer, Holland

γ - Globulin aus Rinderserum, lyophil. rein, Serva

Humanalbumin, Behringwerke, Marburg

Natriumacetatpuffer 0,05 M pH 6,2

Natriumacetatpuffer 0,2 M pH 6,2

Norit A, pract., Serva

Perchlorsäure p.A. 70%, E. Merck

Phosphatpuffer 0,05 M pH 7,4

Schwefelsäure p.A. ca. 95% - 97%, E. Merck

Szintigel, Roth KG, Karlsruhe

Bio Sil A 250-325 mesh, Bio Rad Laboratories, Richmond, Calif.

Dünnschichtplatten Polygram^{R} Sil G/UV$_{254}$, 0,25 mm Silica ohne Gips mit Fluoreszenzindikator UV$_{254}$, Macherey-Nagel, Düren

Glasfiberpapier Whatman GF/D, Balston Ltd., England

Glaswolle, Kobe, Marburg

Phasentrennfilter Whatman 1 PS, Balston Ltd.

Christ Kühlzentrifuge U III KS, Heraeus-Christ, Osterode

Christ Tischzentrifuge UJ I S, Heraeus-Christ

Automatic gamma counting system - Searle 1185 system, G.D. Searle GmbH - Nuclear Chicago Division, Heusenstamm

Köttermann Schüttler Typ 4010, Köttermann KG, Hänigsen

Köttermann Wasserbad Ty 3048

Packard Tri Cars Liquid Scintillation Spectrometer, Automatic Control, Model 574, Packard Instrument International S.A., Zürich

Sorvall Superspeed RC 2-B automatic refrigerated centrifuge, Hormuth-Vetter, Heidelberg

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Die Wirkung von Lithium auf die endokrine Funktion von Schilddrüse und Nebennierenrinde im Tierversuch

in der Medizinischen Universitätsklinik Marburg unter Leitung von Prof. Dr. med. H. Gerdes ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: Acta Endocrinol.Suppl.1977

Marburg, den 30.6.78

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Prof. Dr. med. H. Gerdes herzlich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates danken.

Herrn Dr. med. A. Scheuer danke ich für die wertvollen Anregungen bei der Ausarbeitung der Silicagelsäule zur chromatographischen Corticosteronextraktion, Frau L. Kopp gilt mein besonderer Dank für den fachlichen Rat bei der Ausführung der Versuche. Herrn Dr. med. F. Köhler danke ich für die freundliche Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung der Schilddrüsen- und Nebennierenpräparate.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

in Leuven: Apers, Ghosez, Laporte, Latteur, Moens

in Marburg: Buchholz, Daume, Exner, Friedrich, Gerdes, Hamelmann, Hardewig, Hensel, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Joseph, Karlson, Klaus, Kleinsasser, Knauff, Koransky, Lüdtcke, Martini, Oepen, Petry, Pohlen, Rodeck, Rohen, Schmitz-Moormann, Siegert, Sodomann, Solcher, Straub, Wendt, Willenbockel.

Lebenslauf

Am 6.09.1951 wurde ich, Bertram Schollmeier, als zweites von vier Kindern des Sonderschulrektors Bernhard Schollmeier und seiner Frau Maria, geb. Sonnabend, in Heppenheim/Bergstraße geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Heppenheim (1958-1962) wechselte ich auf den altsprachlichen Zweig des Alten Kurfürstlichen Gymnasiums in Bensheim/Bergstraße, wo ich 1970 das Abitur ablegte.

Zum Studienjahr 1970/71 immatrikulierte ich mich in den Fächern Französisch und Humanmedizin an der Université Catholique de Louvain (Löwen) in Belgien und legte dort 1972 das Vorphysikum ab. Ab dem 3. Semester setzte ich das Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg fort. Physikum 1974. 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach der Approbationsordnung für Ärzte 1975, 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1977. Im Anschluß daran Ableistung des "praktischen Jahres" nach der AOfÄ an der Philipps-Universität Marburg in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Radiologie. Den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im April 1978 ab.